

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Příprava a využití kyselých proteas pro štěpení proteinů
v experimentech H/D výměny

Preparation and use of acid proteases for digestion in H/D exchange

Diplomová práce

Bc. Jan Kukla

Školitel: RNDr. Petr Man, PhD

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Petra Mana, PhD a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Praha, 7. 5. 2014

Podpis:

Poděkování

Rád bych zde poděkoval svému školiteli a vedoucímu práce RNDr. Petru Manovi, PhD. za ochotu, čas a rady, které mi v průběhu celé práce poskytoval. Dále bych rád poděkoval zejména Mgr. Ljubině Ivanové a RNDr. Hynkovi Mrázkovi PhD za vedení v molekulárně biologické části projektu a Mgr. Alanu Kádkovi za pomoc a cenné rady při řešení dalších částí projektu. Dík patří i všem ostatním členům laboratoře za vytvoření příjemného a přátelského prostředí. V neposlední řadě patří můj dík mé rodině, přátelům a blízkým, kteří mne po celou dobu studia podporovali.

Abstrakt

Vodík/deuteriová výměna ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HX-MS) využívá spontánní výměny amidických vodíků proteinové páteře za atomy deuteria z roztoku k získání informace o změnách v proteinové struktuře. Pro lokalizaci těchto změn na konkrétní oblasti proteinu je nejčastěji využívána enzymatická digesce zkoumaných proteinů aspartátovými proteasami. Schopnost proteas produkovat malé překrývající se peptidy, které dostatečně pokrývají celou proteinovou sekvenci, je zásadní pro lokalizaci konkrétních oblastí, které nás v proteinu zajímají. V této práci byly připraveny rekombinantní proteasy nepenthesin I (z *Nepenthes gracilis*) a rhizopuspepsin (z *Rhizopus chinensis*) a byly srovnány s komerčně dostupnými proteasami prasečím pepsinem A a aspergillopepsinem (z *Aspergillus saitoi*). Porovnání bylo provedeno aktivními testy, kdy byl zkoumán vliv pH, teploty a denaturačních a redukčních činidel na stabilitu a aktivitu proteas v roztoku. Všechny čtyři proteasy byly imobilizovány na polymerní nosič POROS a jejich aktivita v online HX-MS uspořádání byla testována štěpením myoglobinu jako modelového substrátu.

Abstract

Hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry (HX-MS) utilizes the spontaneous exchange of protein backbone amide hydrogens for deuterium atoms from solution to gain information about changes in protein structure. To localize these changes to specific areas of the protein, enzymatic digestion by aspartate proteases is used. The proteases' ability to produce small overlapping peptides and to provide full sequence coverage of the studied protein is essential for pinpointing the protein regions of interest. In this study recombinant proteases nepenthesin I (*Nepenthes gracilis*) and rhizopuspepsin (*Rhizopus chinensis*) were prepared and compared to commercially available proteases porcine pepsin A and aspergillopepsin (*Aspergillus saitoi*). The comparison was performed using various activity assays, where the effects of pH, temperature and denaturing and reducing agents on the activity of the proteases were studied. All four proteases were also immobilized on a polymeric resin POROS and their activity in an online HX-MS digestion setup was tested using myoglobin as a model substrate.

Seznam zkratek

AP	aspartátová proteasa
Apn	aspergillopepsin z <i>A. saitoi</i>
BCA	kyselina bicinchoninová
BSA	hovězí sérový albumin
CAPS	kyselina 3-(cykloakrylamino)-1-propansulfonová
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraacetát
ESI	ionizace elektrosprejem
FTICR	iontová cyklotronová rezonance s využitím Fourierovy transformace
Hb	hemoglobin
HX	vodík/deuteriová výměna
IPTG	isopropylthiogalaktopyranosid
MALDI	ionizační technika (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
MS	hmotnostní spektrometrie
Nep	nepenthesin
NMR	nukleární magnetická rezonance
OD ₅₅₀	optická densita při 550 nm
PM	plasmepsin
PMSF	fenylmetylsulfonilflourid
Ppn	prasečí pepsin A

Rpn	rhizopuspepsin
SAXS	nízkoúhlový rozptyl Roentgenova záření
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného
TCA	trichloroctová kyselina
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED	1,2-bis(dimethylamino)-ethan
TOF	detektor doby letu (Time Of Flight)
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid

Obsah

1 Úvod.....	- 11 -
1.1 Vodík/deuteriová výměna	- 11 -
1.1.1 Provedení pokusu	- 17 -
1.2 Aspartátové proteasy	- 21 -
1.3 Prasečí pepsin A	- 22 -
1.3.1 Pepsin z úhoře <i>Monopterus albus</i>	- 23 -
1.4 Nepenthesin.....	- 24 -
1.5 Rhizopuspepsin	- 26 -
1.6 Aspergillopepsin	- 27 -
1.7 Další aspartátové proteasy.....	- 28 -
1.7.1 Plasmepsin.....	- 28 -
2 Cíl práce.....	- 29 -
3 Materiál	- 30 -
3.1 Přístroje	- 30 -
3.2 Komerční sady	- 31 -
3.3 Chemikálie	- 32 -
3.4 Enzymy	- 33 -
3.5 Inhibitory proteas	- 33 -
3.6 Vektory.....	- 34 -
3.7 Bakteriální kmeny	- 34 -
3.8 Média.....	- 34 -
3.9 Roztoky a pufry	- 34 -
4 Metody	- 36 -
4.1 Molekulárně biologická část	- 36 -
4.1.1 Transformace kompetentních buněk	- 36 -
4.1.2 Minipreparace DNA a ověření insertu pomocí restrikčního štěpení	- 36 -

4.1.3 Agarosová elektroforéza.....	- 37 -
4.1.4 Maxipreparace DNA	- 37 -
4.1.5 Stanovení koncentrace izolované DNA.....	- 37 -
4.1.6 Transformace kompetentních buněk - produkční kmeny	- 38 -
4.1.7 Test produkce proteinů	- 38 -
4.1.8 Polyakrylamidová elektroforéza v prostředí SDS	- 39 -
4.2 Expres a renaturace proteinů	- 39 -
4.2.1 Velkoobjemová produkce proteinu	- 39 -
4.2.2 Izolace inkluzních tělísek	- 40 -
4.2.3 Renaturace proteinu <i>in vitro</i>	- 40 -
4.2.4 Stanovení koncentrace pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA).....	- 41 -
4.2.5 Ověření proteinů po renaturaci pomocí MALDI-TOF MS	- 41 -
4.3 Závislost aktivity proteas na experimentálních podmínkách.....	- 41 -
4.3.1 Zkouška aktivity enzymu	- 41 -
4.3.2 Závislost aktivity na teplotě.....	- 42 -
4.3.3 Závislost aktivity na pH.....	- 42 -
4.3.4 pH stabilita.....	- 42 -
4.3.5 Vliv denaturačních a redukčních činidel	- 42 -
4.4 Imobilizace proteas a MS	- 43 -
4.4.1 Gelová filtrace	- 43 -
4.4.2 Imobilizace proteas.....	- 43 -
4.4.3 Plnění kolon.....	- 44 -
4.4.4 On-line digesce proteinu a MS analýza.....	- 44 -
5 Výsledky	- 46 -
5.1 Úvod k výsledkům	- 46 -
5.2 Příprava plasmidů kódujících rhizopuspepsin a nepenthesin I	- 46 -
5.2.1 Měření čistoty a koncentrace DNA	- 46 -

5.2.2 Test produkce proteinů	- 47 -
5.3 Exprese a renaturace proteinů	- 49 -
5.3.1 Renaturace proteinů <i>in vitro</i> včetně optimalizace	- 49 -
5.3.2 Ověření proteinů po renaturaci pomocí hmotnostní spektrometrie.....	- 49 -
5.4 Závislost aktivity proteas na experimentálních podmínkách	- 51 -
5.4.1 Závislost aktivity na teplotě.....	- 51 -
5.4.2 Závislost aktivity na pH reakčního prostředí.....	- 52 -
5.4.3 pH stabilita.....	- 52 -
5.4.4 Vliv denaturačních a redukujících činidel	- 54 -
5.5 Imobilizace proteas	- 56 -
4 Diskuze	- 58 -
5 Souhrn	- 62 -
Citace	- 63 -
Přílohy.....	- 68 -

1 Úvod

1.1 Vodík/deuteriová výměna

Proteiny hrají ústřední roli ve většině biologických procesů zahrnujících mimo jiné DNA replikaci, buněčné dělení, buněčnou smrt, imunitní odpověď či buněčnou signalizaci. Většina z těchto procesů je prováděna multiproteinovými komplexy [1]. K plnému pochopení, jak proteiny pracují a přispívají k základním biologickým a biochemickým pochodům, jsou zapotřebí techniky, které pomohou pochopit strukturně-funkční vztahy a umožní popis interakcí mezi proteiny v komplexech [2]. V minulých 60 letech byly zdokonaleny techniky pro analýzu proteinů, kterými jsou například nukleární magnetická rezonance, rentgenová krystalografie či do určité míry kryoelektronová mikroskopie [3]. Tyto metody poskytují vysoce detailní strukturní data, avšak většinou vyžadují velké množství vysoce rozpustného homogenního proteinu [4]. Krystalografie též poskytuje statický obrázek a nepostihuje dynamiku proteinu. Často se také stává, že je možné získat pouze strukturu za určitých experimentálních podmínek a nelze například připravit difrakující krystal proteinu s libovolnými navázanými ligandy [5]. Nukleární magnetická rezonance naproti tomu poskytuje určité informace o dynamice proteinu, avšak i tato metoda má řadu limitací. Pro úspěšné vyřešení proteinové struktury je zapotřebí homogenního proteinového preparátu, který je dlouhodobě stabilní za vysokých koncentrací a je také nezbytné připravit tento protein izotopicky (^{13}C , ^{15}N) značený. Nelze také nezmínit velikostní limit, který neumožňuje řešit strukturu větších proteinů. Neopomenutelným faktem je také velká časová náročnost obou výše uvedených technik. Proto je v řadě případů přistupováno ke studiu dynamického chování proteinů a ke studiu interakcí proteinů s různými ligandy prostřednictvím jiných biofyzikálních technik [6]. Mezi ně lze řadit např. nízkouhlový rozptyl Roentgenova záření (SAXS), spektroskopické techniky, kalorimetrická měření, analytickou ultracentrifugaci, či techniky strukturní hmotnostní spektrometrie jako je chemické sítění, iontová mobilita či vodík/deuteriová výměna. Poslední zmíněný jev byl poprvé pozorován v 50 letech 20. století a tato pozorování jsou spjata se jménem Kaj Ulrik Linderstrøm-Lang [7].

Linderstrøm-Lang mimo jiné studoval proteolytickou aktivitu enzymů. Jeho práce na vztazích mezi denaturací a proteolýzou ho postupně přivedla do bodu, kdy se začal dívat na strukturu proteinu více z dynamického úhlu pohledu. Na nějakou dobu se zaměřil na studium mechanismu, ve kterém nepřístupné peptidové vazby se stávají přístupnými enzymové

proteolýze [8]. Snažil se také určit, zda α -helixy a β -skládané listy jsou přítomné v globulárním proteinu. K tomu využíval gradientovou trubici a následně měřil obsah deuteria a vody a získával různé poměry H/D. Z výsledků experimentů odvodil, že vodíková výměna je velmi rychlá, pokud byl vodík vázán na silně elektronegativní prvek, jakým byl O, nebo N. Zároveň logicky odvodil, že vodíky peptidových vazeb zapojených do sekundárních struktur vyměňují velmi pomalu. Na základě těchto pokusů představil svůj koncept, že proteiny mají primární, sekundární a terciární strukturu. Metoda byla založena na použití gradientové tuby a výměna byla ukončena zmrazením vzorku na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté následovala kryosublimace rozpouštědla pro analýzu hustoty. V roce 1960 byla těžká technika kryosublimace nahrazena infračervenou spektroskopií. Od roku 1963 se v Anglii využívala tritiová (^3H) výměna s gelovou filtrací až konečně bylo pospáno využití této metody ve spojení s nukleární magnetickou rezonancí [9, 10, 11].

V roce 1991 Katta a Chait popsali využití hmotnostní spektrometrie (MS) k monitorování vodíkové výměny (HX) proteinů [12]. V roce 1993 bylo popsáno D. Smithem využití digesce pepsinem v těchto experimentech [13], čímž bylo možno dosáhnout přesnější lokalizace strukturních změn na proteinu [4].

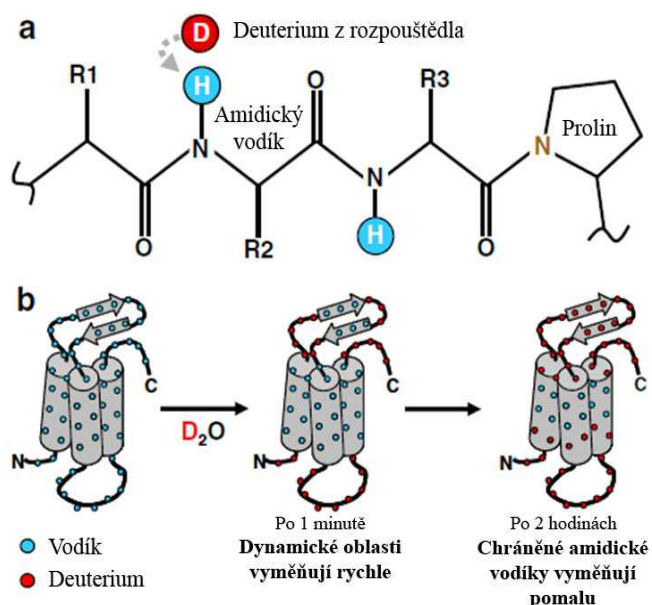
Mezi výhody techniky HX-MS patří malá spotřeba vzorku, možnost pracovat za jakýchkoliv experimentálních podmínek a za nízkých koncentrací proteinu. Metodika také nemá limitaci danou velikostí proteinu a je třeba možné provádět analýzu proteinu ze směsí a to technikou nazvanou SUPREX (Stability of Unpurified Proteins from Rates of H/D EXchange)[14]. Metodou HX-MS nelze získat informace o meziatomových vzdálenostech v proteinu, či o jeho vysoce rozlišené 3D struktuře [4]. Přesto dává zajímavé informace o vlivu mutací na trojrozměrnou (3D) strukturu proteinu, o konformačních změnách indukovaných vazbou ligandu, o interakci protein-protein, o různých typech komplexů, o skládání a rozvolňování struktury proteinu, umístění a vlastnostech aktivního místa nebo o disociačních konstantách [15].

Technika HX-MS využívá jevu, kdy amidické vodíky v peptidové vazbě, jsou vyměňovány za vodíky rozpouštědla (obrázek 1-1a).

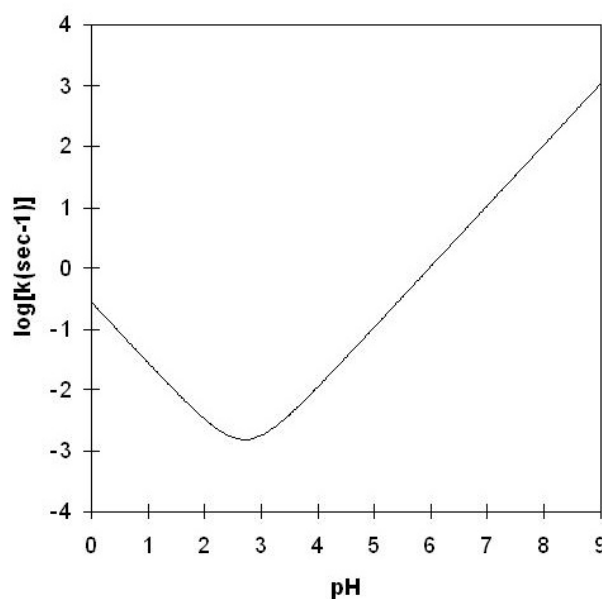
Všechny aminokyseliny, vyjma prolinu, mohou vyměňovat své amidické vodíky [16]. Vodíková výměna neprobíhá pouze u vodíků v peptidové vazbě. Vodíky na uhlících mohou vyměňovat s malou rychlostí, ale spíše nevyměňují vůbec, zatímco vodíky funkčních skupin postranních řetězců aminokyselin vyměňují s rychlostí, která je mnohonásobně větší, než u těch v peptidové vazbě. A tak u nich dochází v průběhu experimentu k rychlé zpětné výměně deuterií za vodíky [2].

Na vodíkovou výměnu v proteinech má vliv několik faktorů. Mezi čtyři hlavní patří pH, teplota, přístupnost rozpouštědla a vodíkové vazby v proteinu [17]. Teplotu a pH lze v průběhu experimentu kontrolovat a případně i měnit. Zbylé dva faktory jsou záležitostí struktury proteinů a dají se ovlivnit přidáním denaturačních činidel.

Na obrázku 1-2 je ukázán vliv pH na rychlost výměny (vyjádřeno jako $\log k$). Nejmenší rychlosti výměny je dosaženo při pH 2,5-3,0 v závislosti na aminokyselinovém složení. Z toho vyplývá i experimentální nastavení a nutnost snížit po značení deuteriem pH celé



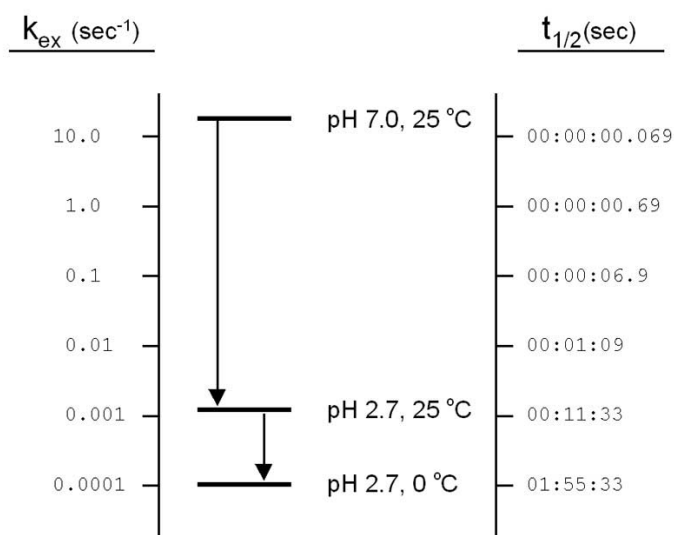
Obrázek 1-1a: Výměna vodíku na amidu v peptidové vazbě za deuterium z roztoku. **1-1b:** Celková výměna vodíků na proteinu v závislosti na čase stráveném v deuteracním roztoku při pH 7. Obrázek převzat z [2].



Obrázek 1-2: Závislost rychlosti výměny na pH roztoku. Nejmenší rychlosti výměny je dosaženo při pH 2,5-3,0. Experiment byl prováděn s polyA (alanin) peptidem. Převzato z [18].

směsi a držet ho nízké po dobu analýzy. Dalším zmíněným faktorem, který lze přímo ovlivnit v laboratoři je teplota při izotopickém značení a následné snížení teploty po ukončení značení.

Na obrázku 1-3 je zachycen vliv teploty a pH na výměnu (k_{ex}) a poločas zpětné výměny ($t_{1/2}$). Z obrázku je patrné, že snížením pH ze 7,0 na 2,7 se snížila rychlost výměny o čtyři řády, a zároveň se prodloužil poločas výměny na přibližně 11 minut [19]. Snížením teploty z 25°C na 0°C se pak již rychlost výměny zmenší pouze o řád, ale poločas života inkorporovaného deuteria se tak zvýší až na téměř 2 hodiny. Tento čas je již pro LC-MS analýzu naprosto dostačující.



Obrázek 1-3: Vliv pH a teploty na rychlost výměny a dobu, po kterou je deuterium inkorporováno do proteinu. Změna pH snižuje výrazně rychlost výměny a snížením teploty se výrazně prodlouží doba, po kterou je protein označen deuteriem, než dojde ke zpětné výměně. Převzato z [18].

Rychlou výměnu (a tedy i značení) vykazují oblasti proteinu, které jsou vysoce dynamické a dobře vystavené rozpouštědлу. Příkladem dobře vyměňujících úseků proteinu jsou smyčky spojující α -helixy, obrázek 1-1b. Na druhou stranu regiony, které jsou méně dynamické a (nebo) zapojené ve vodíkových vazbách, popřípadě jsou skryté uvnitř proteinu (β -skládaný list a α -helixy), budou vyměňovat pomaleji. V tomto případě může výměna trvat vteřiny až hodiny [20].

Celý děj výměny lze popsat příslušnými rychlostními konstantami k . Vodíková výměna proteinu je sumou dvou mechanismů, a to výměny v jeho složené a rozvolněné formě. Obrázek 1-4, strana 15, ukazuje dva modely výměny amidických vodíků pro složený stav a lokálně rozvolněný stav. Celková rychlostní konstanta pro izotopickou výměnu každého amidu proteinové páteře k_{ex} může být popsána rovnicí 1.1.

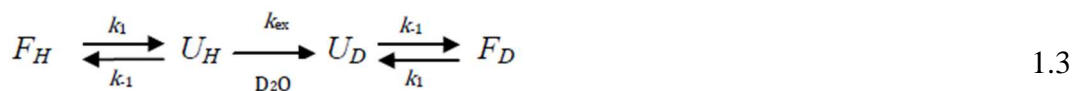
$$k_{ex} = k_f + k_u = (\beta + K_{unf})k_2 \quad 1.1$$

Zde je k_{ex} vyjádřena jako suma příspěvků výměny ze složené (k_f) a rozvolněné (k_u) formy proteinu. Mechanismus popsáný rovnicí 1.1 je graficky znázorněn na obrázku 1-4. Výměna ve složené formě pravděpodobně převládá u amidických vodíků, které netvoří vodíkovou vazbu a jsou umístěné blízko povrchu. Výměna v rozvolněné formě vyžaduje značný pohyb v peptidové páteři. Rozvolnění a vystavení páteřních amidických vodíků deuteriu, může být izolováno do malých oblastí (lokální rozvolnění) nebo může zahrnovat celý protein (globální rozvolnění). Rychlostní konstanta pro výměnu ze složeného stavu, k_f je popsána rovnicí 1.2

$$k_f = \beta k_2 \quad 1.2$$

Kde β je faktor pravděpodobnosti výměny ze složené formy a k_2 je rychlostní konstanta pro HX každého amidu proteinové páteře v teoretickém nestrukturovaném peptidu. Hodnota faktoru β se pohybuje od 0 do 1 a tento parametr zahrnuje přístupnost rozpouštědla a také pravděpodobnost zapojení amidického vodíku do intramolekulární vodíkové vazby [21].

K_{unf} v rovnici 1.1 je rovnovážná konstanta popisující proces rozvolňování. HX-NMR studie využily denaturanty k rozlišení mezi β a K_{unf} . Rychlostní konstanta pro výměnu z rozvolněných forem (k_u) proteinu závisí na rychlostní konstantě pro výměnu z teoretického nestrukturovaného peptidu (k_2) stejně jako na dynamice rozvolňování popsané konstantami k_1 a k_{-1} jak ukazuje rovnice 1.3, kde F a U jsou složené, resp. rozvolněné formy proteinu.



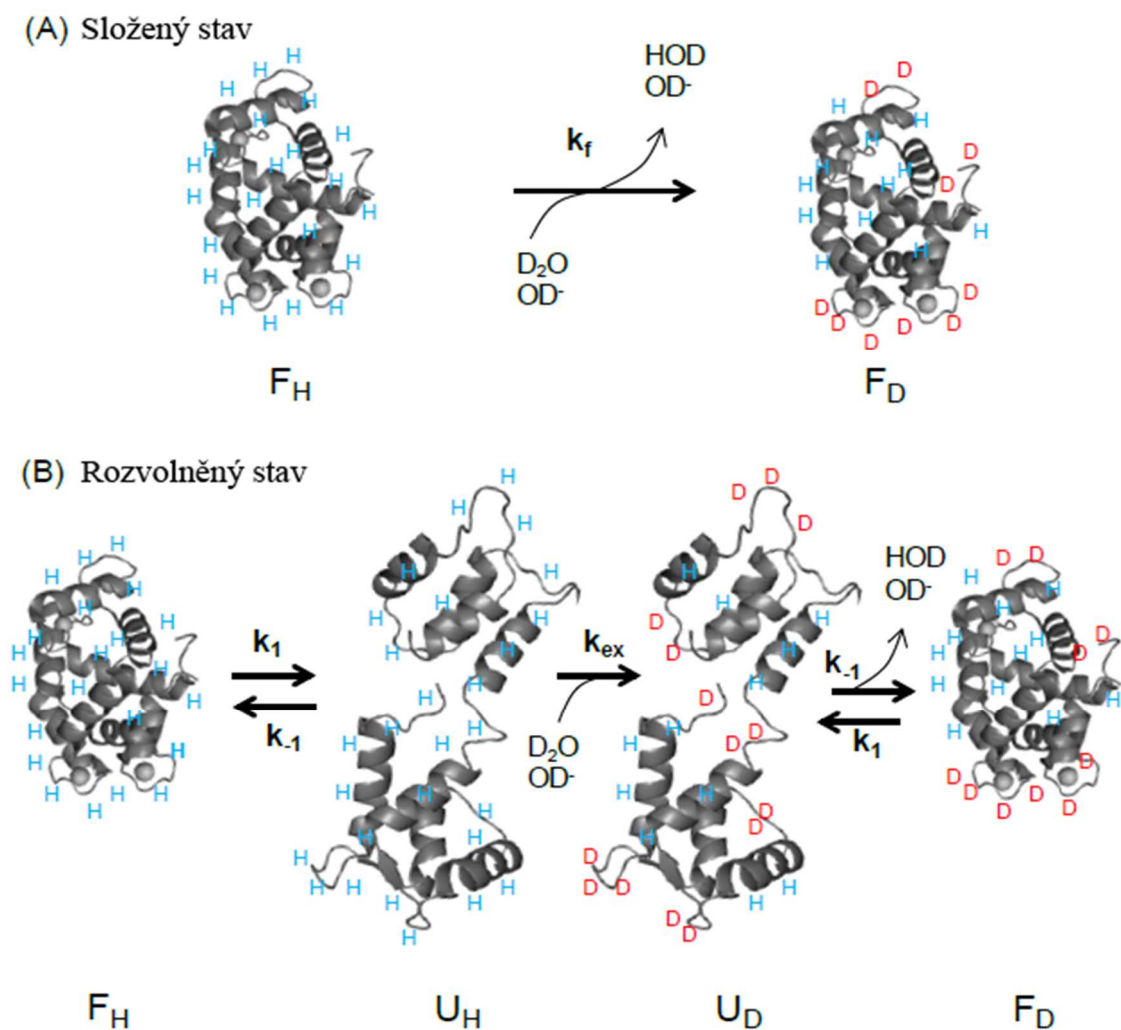
Když $k_2 \gg k_{-1}$ (označované jako EX1 kinetika) je rychlostní konstanta pro výměnu z rozvolněné formy je dána rychlostní konstantou rozvolňování k_1 (rovnice 1.4)

$$k_u = k_1 \quad 1.4$$

Nicméně při fyziologických podmínkách je mnohem běžnější, že $k_{-1} \gg k_2$. V tomto případě (tzv. EX2 kinetika) je rychlostní konstanta pro výměnu rozvolněné formy dána rovnicí 1.5, kde K_{unf} je rovnovážná konstanta popisující proces rozvolňování [21].

$$k_u = \frac{k_1}{k_{-1}} k_2 = K_{unf} k_2 \quad 1.5$$

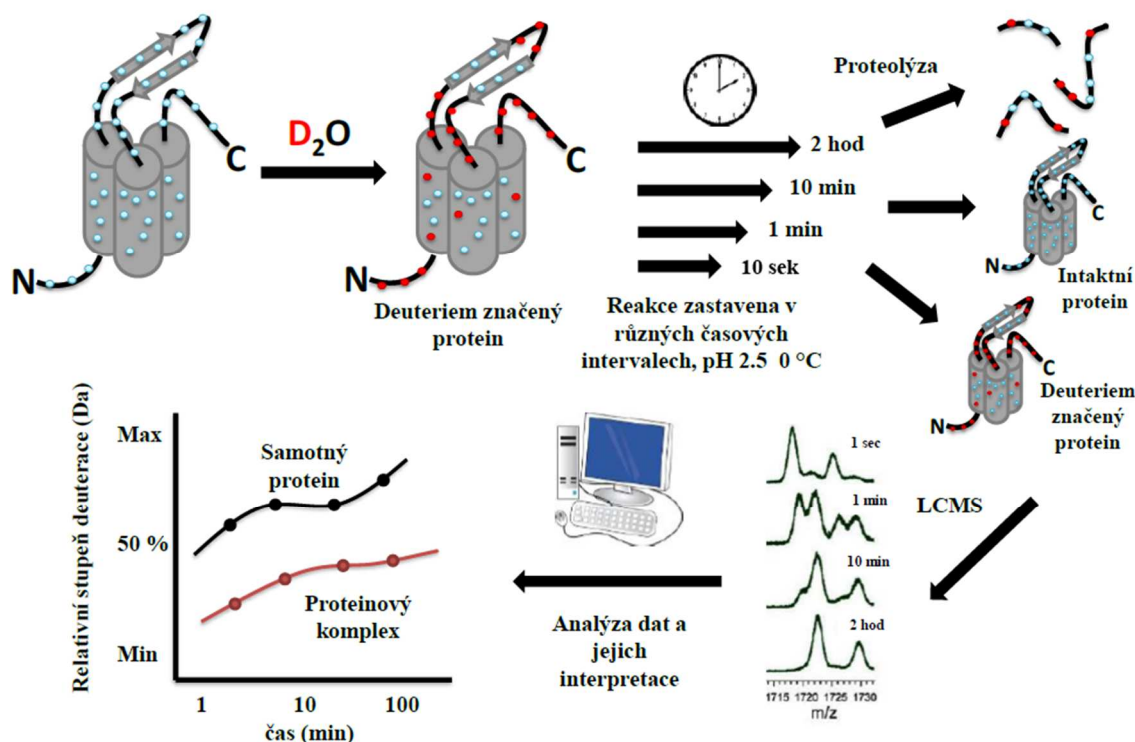
Zatímco pouze několik proteinů podstupuje EX1 kinetiku přirozeně, všechny proteiny podstupují EX2 kinetiku výměny při fyziologických podmínkách. Některé proteiny mohou obsahovat oblasti, které podléhají kinetice EX1 a EX2 současně. Regiony, ve kterých probíhá buď výměna EX1 nebo EX2 kinetikou, mohou být identifikovány charakteristickým izotopickým vzorem v hmotnostním spektru [21].



Obrázek 1-4: Dva modely pro výměnu amidických vodíků peptidové vazby. Vodík je značen modrou barvou a deuterium červenou. Rovnováha mezi složeným stavem pouze s vodíky (F_H) a složeným stavem s deuterii (F_D) je ukázána v A. Lokální rozvolněné stavy jsou ukázány v B. Dále jsou zde ukázány rychlostní konstanty skládání (k_f) rozvolňování (k_1) a renaturace (k_{-1}). Převzato a upraveno z [22].

1.1.1 Provedení pokusu

Na začátku pokusu je vzorek proteinu (nejčastěji pH 7, laboratorní teplota) naředěn nadbytkem pufru v D_2O (běžné je 5-10 \times) a inkubován po různě dlouhou dobu (od vteřin, přes hodiny až po dny). Značení proteinu lze kdykoliv zastavit použitím zastavovacího pufru. Při zastavování vodík/deuteriové výměny je roztok proteinu naředěn zastavovacím pufrem (1-20 \times), který sníží pH směsi na hodnotu 2,5. Aby se co nejvíce zabránilo zpětnému vyměňování deuteria za vodíky z roztoku, je celá směs navíc prudce ochlazená na teplotu 0 °C [3]. Na obrázku 1-6 je schéma provedení HX-MS experimentu.

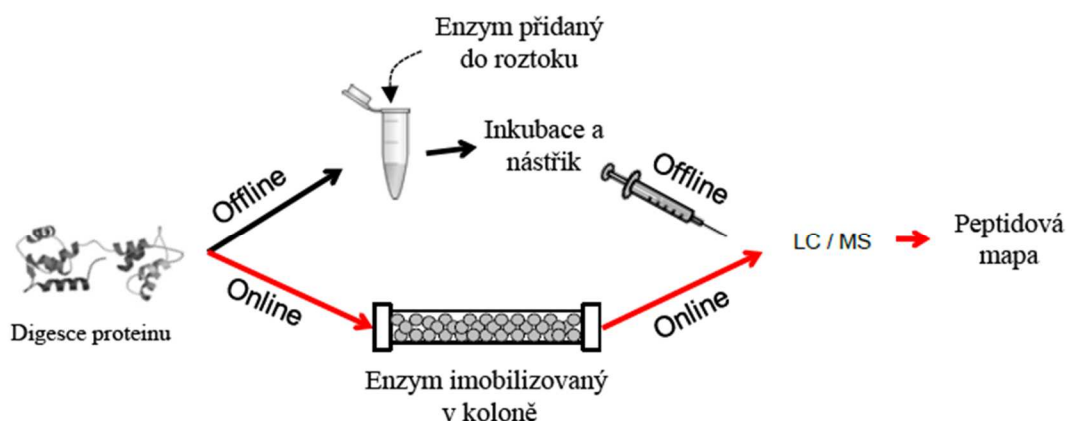


Obrázek 1-6: Obecné schéma provedení HD experimentu v provedení kontinuálního značení, analýza dat a jejich interpretace. Izotopová výměna je iniciována zředěním vzorku pufrem v D_2O . V různých časových intervalech jsou prováděny odběry vzorků. Značení je ukončeno okyselením roztoku na pH 2,5 a snížením teploty na 0°C. Následuje proteolýza a separace vzniklých peptidů pomocí HPLC spojená s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Míra deuterace je extrahována z hmotnostních spekter a interpretace je provedena v kontextu známé struktury a jiných biofyzikálních dat. Obrázek převzat upraven z [2].

Po ukončení značení lze celý protein po rychlém odsolení přímo analyzovat hmotnostním spektrometrem. Měřením molekulové hmotnosti celého proteinu získáme globální informaci o výměně. Můžeme pozorovat rozdíl mezi různými stavy (například protein s ligandem/bez ligandu), ale nevíme, kam rozdíly lokalizovat v molekule proteinu. Druhým (používanějším) přístupem je štěpení značeného proteinu proteasou a analýza deuterace vzniklých peptidů. Podmínky, za kterých je zpětná výměna nejmenší, omezují výběr proteas na kyselé (nejčastěji pepsin). V tomto směru bylo popsáno použití dalších

kyselých proteas (mimo pepsinu [16, 23]) jako je například nepenthesin [24, 25], aspergillopepsin [16, 15] a rhizopuspepsin [6].

Pro zvýšení účinnosti digesce proteasou může zastavovací pufr obsahovat i chaotropní a redukční činidla k denaturaci vzorku a redukci disulfidových můstků [20]. Pro štěpení proteasou byly vyvinuty dva přístupy. Prvním je tzv. offline digesce, tedy v roztoku, kdy je enzym přidán do roztoku proteinu. Digeste v roztoku má tu nevýhodu, že se používá větší množství proteasy, což vede ke zvyšování analytického pozadí. Dále může použít proteasa podléhat autodigesti a navíc je citlivější na použití denaturujících a redukčních činidel. Druhým, a používanějším přístupem, je online digesce, tedy digesce průtokem. Při online digesti protéká značený protein skrz kolonu s imobilizovanou proteasou. Na obrázku 1-7 je ukázán rozdíl mezi online a offline provedením.

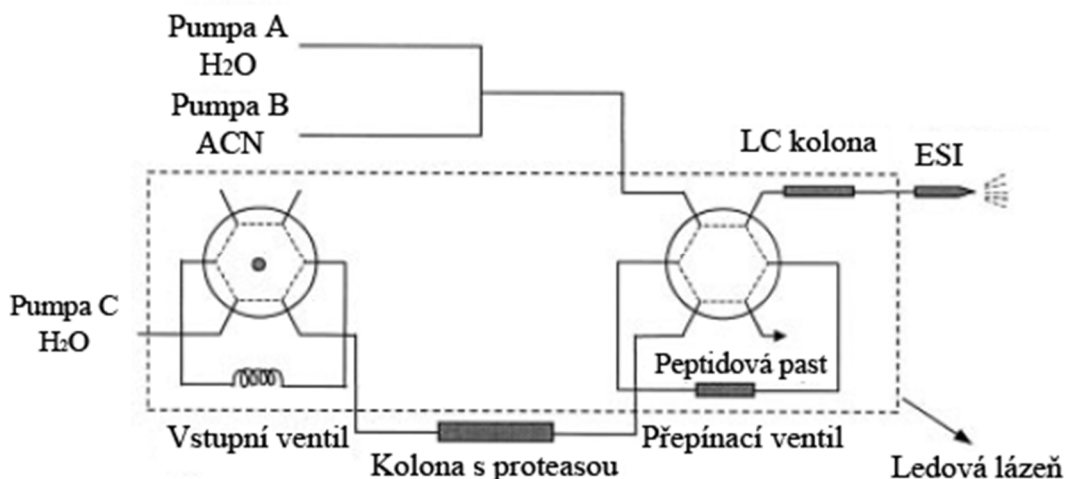


Obrázek 1-7: Online a offline provedení digesce proteinu proteasou. Při offline digesti je enzym přidán přímo do roztoku značeného proteinu. Při online digesti protéká značený protein kolonou s imobilizovanou proteasou. Převzato a upraveno z [26].

Výhodou tohoto uspořádání je, že imobilizace zvyšuje stabilitu a odolnost proteasy vůči denaturačním a redukčním činidlům. Navíc lze tyto kolony opakovaně používat se stejnými výsledky. Byly popsány práce, kde byly imobilizovány mimo pepsinu [27] i další proteasy, jakými jsou rhizopuspepsin [28], nepenthesin [25], aspergillopepsin a další [28].

Na obrázku 1-8 je ukázáno zapojení pro analýzu vzorku při online digesti značených proteinů. Na začátku je vstupní ventil, skrz který je značený vzorek nastříknut do plnicí smyčky o definovaném objemu. Následně je ventil otočen a isokraticky čerpaná mobilní fáze vytlačuje vzorek ze smyčky do kolony s proteasou. Zvolením různé rychlosti průtoku měníme dobu, kterou vzorek stráví v proteasové koloně. Poté jsou vzniklé peptidy eluovány do smyčky s peptidovou pastí (s obrácenou fází), kde dochází k jejich odsolení a koncentraci.

Následně je peptidová past zařazena do okruhu druhého HPLC otočením přepínacího ventilu. Tím jsou peptidy gradientově eluovány skrz analytickou separační kolonu s obrácenou fází, kde dochází k jejich separaci a následně vstupují přímo do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Tato část separace se taktéž děje při teplotě 0-4 °C a pH kolem 2,5, aby byla minimalizována zpětná výměna [20].

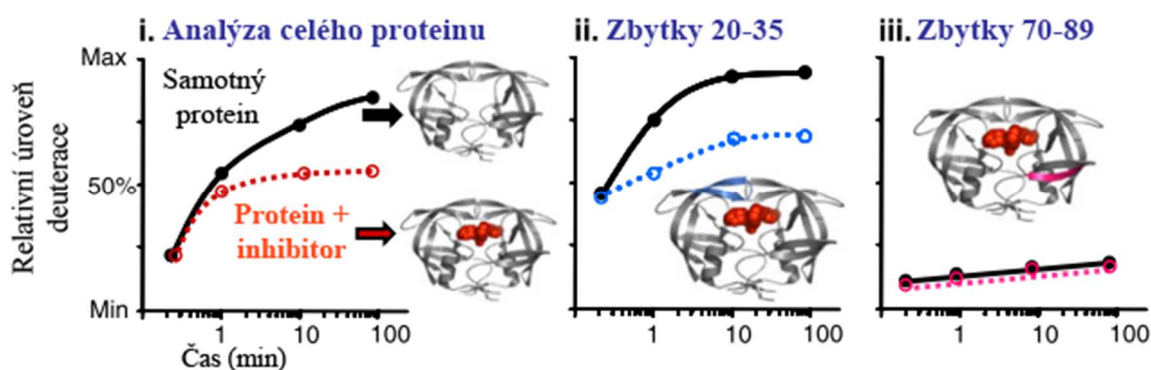


Obrázek 1-8: Detailní zapojení pro online digesci značených proteinů s následnou analýzou peptidových fragmentů pomocí HPLC MS. Převzato a upraveno z [16].

Pro identifikaci vzniklých fragmentů se používá tandemová hmotnostní spektrometrie ve spojení s vyhledáváním v databázi [20].

V roce 1999 byl navržen postup, kdy bylo možné dosáhnout vyššího prostorového rozlišení užitím kolizně indukovaná disociace (CID) deuterovaných proteinů. Následně však bylo objeveno, že ionizace pomocí CID způsobuje tzv. "scrambling", tedy výměnu pozic deuterií na proteinu a dochází ke vzniku nesprávně deuterovaných fragmentů [29, 30]. Nicméně pokud se použijí disociační techniky, jakými jsou ECD (disociace záchytem elektronů) a ETD (disociace přenosem elektronů), je tento jev zcela minimální či je zcela potlačen. Tím lze v ideálním případě dosáhnout rozlišení na úrovni jedné aminokyseliny v experimentech vodík/deuteriové výměny [31, 32].

Výsledky analýzy mohou být vynášeny jako grafy závislosti úrovně deuterace na čase, po který probíhalo značení. Takové grafy jsou ukázány na obrázku 1-9. Na obrázku 1-9(i) je ukázán vliv vazby inhibitoru do aktivního místa proteinu a následná změna konformace, která byla odhalena sníženou úrovní deuterace celého proteinu. Na obrázku 1-9(ii) je ukázán vliv změny konformace na deuteraci určité části proteinu a zároveň na obrázku 1-9(iii) oblast proteinu, na kterou nemělo navázání inhibitoru z pohledu přístupnosti solventu a změny zapojení vodíkových můstků žádný vliv.

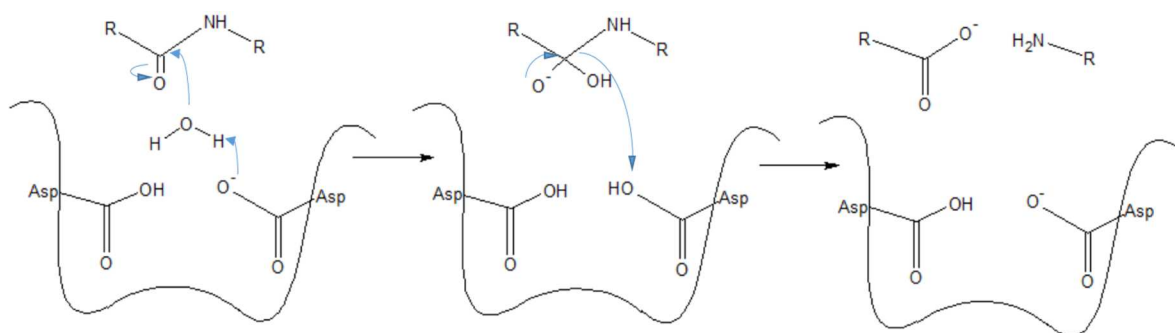


Obrázek 1-9: Vliv inhibitoru na strukturu proteinu a tím na kinetiku deuterace vzorového proteinu. Na obrázku je vliv inhibitoru na úroveň deuterace celého proteinu(i). Dále vliv změny konformace proteinu na deuteraci určité oblasti proteinu (ii). Na posledním grafu (iii) je pak vidět, že v jiné oblasti proteinu vazba inhibitoru neměla vliv. Převzato a upraveno z [2].

1.2 Aspartátové proteasy

Aspartátové proteasy (AP, EC 3.4.23.) jsou široce rozšířenou skupinou proteolytických enzymů. Lze je nalézt ve virech, bakteriích, kvasinkách, rostlinách, houbách a živočiších [33, 34]. Mezi nejznámější zástupce živočišných proteas patří pepsin, kathepsin D, renin, chymosin a proteasa z HIV. Rostlinné AP jsou tvořeny velkou podskupinou takzvaných vakuolární AP. Tyto enzymy mají pro ně typický specifický rostlinný insert, který se vyskytuje v C-terminální doméně [35, 36]. Zvláštním typem těchto rostlinných AP jsou nepenthesiny, které obsahují AP specifický insert nepenthesinového typu, který je odlišný od specifického rostlinného insertu, a proto jsou nepenthesiny zařazeny do vlastní podrodiny [23]. Zástupci AP izolovaných z hub jsou například rhizopuspepsin z *R. chinensis* a aspergillopepsin z *A. saitoi* [37].

AP jsou rozděleny do dvou hlavních rodin dle databáze MEROPS. První je rodina A1, kam patří enzymy podobné pepsinu a druhou rodinou je A2, kde jsou proteasy odvozené od retrovirů [38]. Hlavním rysem proteas rodiny A1 je aktivita v kyselém pH (pH optimum v rozmezí 1,5-5,0) a vysoká citlivost k inhibitoru pepstatinu A. Ze strukturního pohledu mají jeden polypeptidový řetězec o molekulové hmotnosti mezi 32 až 38 kDa. V prostorové struktuře se vyznačují dvěma podobně velkými subdoménami. Aktivní místo se nachází v mezeře mezi dvěma subdoménami a skládá se ze dvou zbytků kyseliny asparagové vyskytujících se v takzvané katalytické triádě. Triáda je složena z aminokyselin -Asp-Thr/Ser-Gly-. AP se exprimují ve formě zymogenů, které jsou schopné auto-aktivace v kyselém prostředí odštěpením části své sekvence [39]. Na obrázku 1-10 je naznačeno obecné schéma štěpení peptidové vazby aspartátovou proteasou.



Obrázek 1-10: Obecné schéma štěpení peptidové vazby aspartátovými proteasami.

Substrátová specifita enzymů je obecně graficky zobrazována jako na obrázku 1-11, kde pozice P_1 - P_3 předchází v sekvenci substrátu štěpenému místu a pozice P_1' - P_3' jsou za štěpným místem.



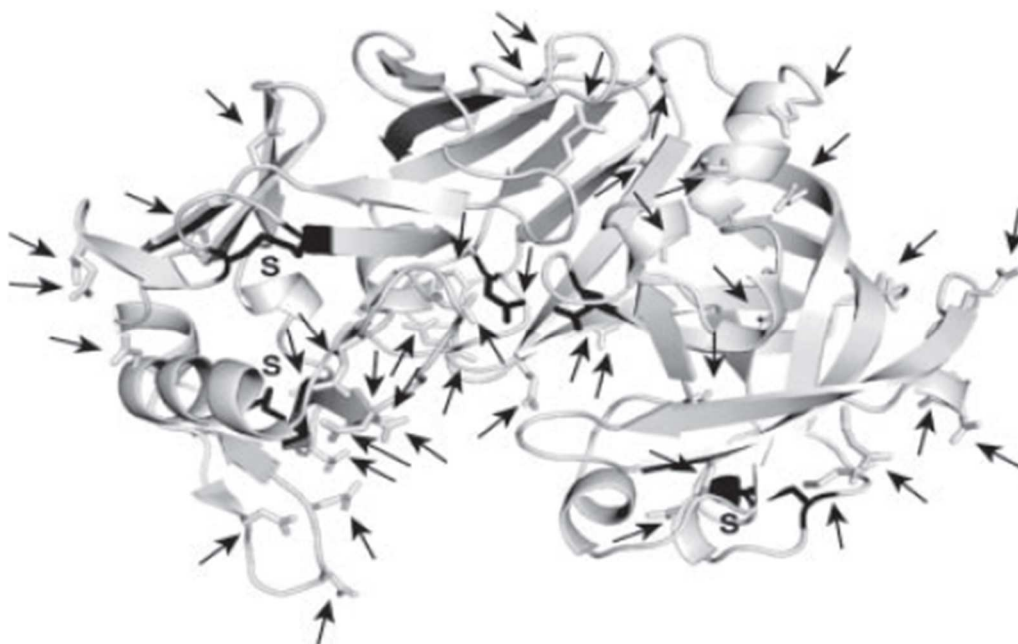
Obrázek 1-11: Nomenklatura štěpení. Pozice P_1 - P_3 jsou před štěpným místem a P_1' - P_3' jsou za štěpným místem. Převzato z [40].

Mezi nejznámější a nejlépe prostudované AP patří pepsin, který se stal jednou z modelových proteas. Vzhledem k vysoké aktivitě pepsinu při nízkém pH je tento enzym využíván při pokusech vodík/deuteriové výměny ve spojení s hmotnostní spektrometrií [23]. Důkazem toho, že prasečí pepsin A je nedostačující proteasou v experimentech vodík/deuteriové výměny, je snaha o získání jeho nových forem s odlišnou substrátovou specifikou a vlastnostmi. Tato snaha vyústila ve studium pepsinu z takových živočichů, jakými jsou například úhoř (*Monopterus albus*), který se vyskytuje v asijských rýžových polích anebo z antarktické ryby *Trematomus bernacchii* z čeledi ledovkovitých [41, 42].

V experimentech vodík/deuteriové výměny jsou proteasy tím, co definuje prostorové rozlišení. V tomto směru proto probíhá hledání nových proteas, které mají odlišnou substrátovou specifitu oproti používaným proteasám. V následujícím textu jsou popsány proteasy, které byly využity pro experimenty HX-MS.

1.3 Prasečí pepsin A

Prasečí pepsin A (EC 3.4.23.1) patří do MEROPS rodiny A1 a je důležitým enzymem v trávicích procesech obratlovců. Je produkován ve formě zymogenu (pepsinogenu) žaludeční sliznicí [43]. Pepsinogeny jsou klasifikovány do pěti skupin na pepsinogen A, B, F, progastriscin a prochymosin. Těchto pět typů pepsinogenů se od sebe liší nejenom v primární struktuře, ale také v enzymatických vlastnostech jejich aktivních forem [41]. Pepsin se stává aktivním autokatalýzou v kyselém prostředí (pH menší než 5) a je ireverzibilně inaktivován při pH větším než 6 [23].



Obrázek 1-12: 3D struktura pepsinu. S, označuje disulfidové můstky. Šipky ukazují místa s kyselými aminokyselinami. Aktivní místo je ukázáno tyčinkovým modelem. Převzato z [44].

Jako všechny aspartátové proteasy se molekula pepsinu skládá ze dvou homologních subdomén tvořených převážně strukturou β skládaného listu, obrázek 1-12, mezi kterými je vazebné místo pro substrát. Obě poloviny obsahují katalytické zbytky kyseliny asparagové Asp32 a Asp152, které jsou umístěny v centru aktivního místa. Aktivovaný protein má v aktivním místě jeden zbytek kyseliny asparagové protonovaný a druhý deprotonovaný [43].

Enzymová specifita, kinetika, mechanismus aktivace z pepsinogenu, katalýza a inhibice pepsinu byla již v minulosti dobře zdokumentována [43]. Jeho specifita je mnohem menší než například specifita trypsinu nebo jiných proteas (Lys-C, Glu-C, Asp-N a dalších). Z provedených experimentů je známo, že pepsin preferuje štěpení za velkými hydrofobními aminokyselinovými zbytky. Obecně lze říci, že pepsin preferuje štěpení za fenylalaninem (F), kyselinou glutamovou (E), a leucinem (L) methioninem (M), v pozici P_1 , kdežto výjimečně štěpí za lysinem (K), histidinem (H) a argininem (R) [23, 25].

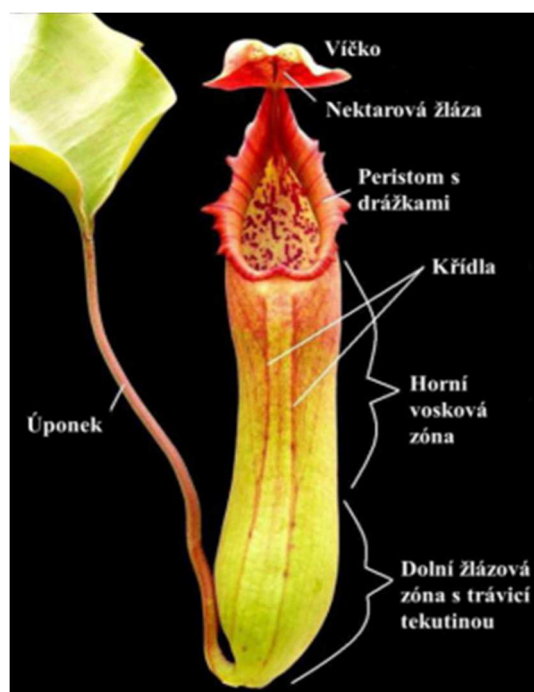
1.3.1 Pepsin z úhoře *Monopterus albus*

Ze žaludku úhoře *Monopterus albus* byly izolovány tři pepsinogeny, a to PG 1,2 a 3. Odpovídající aktivní formy pepsinu pak měly pH optimum 3,5 (pepsin 1) a 3,0 (pepsin 2 a 3). Teplotní optimum těchto pepsinů leží mezi 40 až 45 °C (oboje měřené se substrátem hemoglobinem), oproti 60 °C pro prasečí pepsin A. Pepstatin inhiboval dobře všechny tři

formy pepsinu [41]. Z hlediska substrátové specifity, při použití v H/D experimentech, pepsin z úhoře štěpí v pozici P_1 za fenylalaninem (F) a leucinem (L) s větší frekvencí než prasečí pepsin A. Naproti tomu za kyselinou asparagovou (D) neštěpí. Zajímavostí je taktéž specifita v pozici P_1' , kdy mnohem více štěpí před aminokyselinami lysinem (K) a argininem (R) [23].

1.4 Nepenthesin

Nepenthesiny (*Nep*, EC 3.4.23.12) jsou jednou ze skupin AP reprezentujících rostlinné enzymy. Od klasických vakuolárních enzymů se odlišují ve specifickém insertu, kdy obsahují specifický rostlinný insert nepenthesinového typu, díky kterému se *Nep* řadí do nové podrodiny AP [45]. Nepenthesiny jsou produkovány v pastech masožravých rostlin *Nepenthes* (láčkovky) [46], odkud dostaly svoje pojmenování, ačkoliv je možné je nalézt i v jiných rostlinách, například v huseníčku (*Arabidopsis*) [47] či rosnatce (*Drosera*) [48].



Obrázek 1-13: Past láčkovek s popisky důležitých částí. Převzato z [40].

Láčkovky rostou v oblastech s vysokou vlhkostí, kyselou půdou a v prostředí chudém na důležité živiny. Tyto rostliny si doplňují chybějící látky chytáním hmyzu. Láčka, obrázek 1-13, vznikla přeměnou listu. Skládá se z dolní žláznové zóny, horní voskové zóny a peristomu. Víčko funguje v době zrání láčky jako ochrana pasti a po otevření pasti, jako deštník, který napomáhá proti zředování trávicí kapaliny uvnitř láčky. Peristom pak funguje jako lákadlo, jehož povrch je voskovaný a hmyz po něm sklouzne do láčky. Horní voskovaná vrstva má jediný úkol, a to zabránit chycené potravě v úniku z láčky. Dolní zóna obsahuje trávicí kapalinu a produkční žlázy. Viskóznější kapalina znesnadňuje chycené potravě utéci a navíc ji rozkládá [49, 50, 51]. Pro rozklad kořisti využívá rostlina směs enzymů, které se vyskytují ve šťávě láčky a jsou produkovány sekrečními žlázami na vnitřní straně láčky. Hlavními složkami jsou proteasy a fosfatasy [52].

Obecná charakteristika nepenthesinů je velmi podobná jejich analogům v živočišné říši a je popsána dále v textu. Na obrázku 1-14 je ukázán model nepenthesinu, kde je vyznačeno aktivní místo a disulfidové můstky. Již zmíněný specifický insert nepenthesinového typu obsahuje cysteiny, které přispívají do struktury *Nep* dalšími disulfidovými můstky [53, 54]. Celkem se vyskytuje na jednu molekulu proteinu 12 cysteinových zbytků, které pravděpodobně tvoří celkem šest disulfidových můstků [45]. Velké množství disulfidových můstků, je pravděpodobně zodpovědné za větší stabilitu enzymu, zároveň však může být důvodem citlivosti k redukčním činidlům [44]. Molekulová hmotnost nepenthesinů se pohybuje od 35 do 45 kDa v závislosti na rostlinném druhu a množství glykosylace [44].



Obrázek 1-14: 3D struktura nepenthesinu. *S*, označuje disulfidové můstky. Šipky ukazují místa s kyselými aminokyselinami. Aktivní místo je ukázáno tyčinkovým modelem. Převzato z [44].

Nepenthesiny se vyskytují v trávicí šťávě ve dvou formách označovaných římskými číslicemi I a II (*Nep I* a *Nep II*). Oba mají maximální aktivitu při pH 2,6 (měřeno se substrátem hemoglobinem) a vysokou teplotní stabilitu okolo 50 °C. Speciálně *Nep I*, obrázek 1-14, je stabilní ve velmi širokém rozmezí pH od 3 do 10 jednotek po dobu déle než 30 dní. V délce aminokyselinové sekvence se liší pouze o 1 zbytek, mají tedy 437 (*Nep I*) resp. 438 (*Nep II*) aminokyselinových zbytků. Rozdílem mezi oběma proteasami je šest

potencionálních glykosylačních míst v *Nep I*, oproti žádnému v *Nep II*. Obě formy jsou inhibovány navázáním pepstatinu A [45].

Proteasa *Nep I* byla předmětem výzkumu pro možné použití v experimentech vodík/deuteriové výměny, jelikož mají s odlišnou štěpnou aktivitu oproti pepsinu. *Nepenthesin* štěpí preferenčně v pozicích P₁ za aminokyselinami histidinem (H), lysinem (K) a argininem (R) [25, 39].

1.5 Rhizopuspepsin

Rhizopuspepsin (*Rpn*, EC 3.4.23.6) je proteasa, která je produkována houbou *Rhizopus chinensis* a dalšími. Houba *Rpn* využívá pro rozklad proteinů v růstovém médiu, nebo pro parazitické účely. Houba produkuje rhizopuspepsin ve formě zymogenu, který je posléze autoaktivován odštěpením propeptidu v kyselém prostředí (pH menší než 5) [28].

Rpn patří mezi dobře prostudované proteasy, jehož aminokyselinová sekvence, včetně krystalové struktury a substrátové specifity je již dlouhou dobu známa. Protože struktura aktivního místa *Rpn* je velmi podobná s dalšími proteasami, jakými jsou například renin a hlavně proteasa z lidského imunodeficientního viru (HIV), byl v minulosti využíván jako modelový příklad pro studium těchto a dalších aspartátových proteas [55, 56].

Molekula *Rpn* je složena z 379 aminokyselinových zbytků a má průměrnou molekulovou hmotnost 39,9 kDa. Propeptid je tvořen 42 N-koncovými aminokyselinami [28], a při MS měření je ztráta zaznamenána jako úbytek 6 kDa na molekulové hmotnosti. V aktivním místě jsou opět dva zbytky kyseliny asparagové v pozicích Asp30 a Asp77 [57]. Maximální aktivita *Rpn* se pohybuje v kyselé oblasti s pH optimem rovným 3. Teplotní optimum je podobně jako u jiných AP vysoké a bylo stanoveno na 60 °C [58].

V minulosti byl úspěšně připraven rekombinantní rhizopuspepsin pro studium jeho prostorové struktury a dalších vlastností. Následně po jeho úspěšné produkci byl *Rpn* vyzkoušen v experimentech vodík/deuteriové výměny [28, 56, 15], byl úspěšně imobilizován na nosič a použit v kolonovém provedení. Z hlediska substrátové specifity *Rpn* štěpí v pozici P₁ majoritně za leucinem (L) a lysinem (K) a méně za histidinem (H) [28].

1.6 Aspergillopepsin

Aspergillopepsin (*Apn*, EC 3.4.23.18) je proteasou, kterou produkuje houba *Aspergillus*. V Japonsku se proteas z této houby využívá již po dlouhou dobu ve fermentačním průmyslu pro výrobu japonského rýžového vína, známého jako „sake“. V dnešní době se využívá v enzymových technologiích a potravinářském průmyslu pro produkci například sojové omáčky. Mimo houby *Aspergillus saitoi* se používají i další druhy *A. oryzae*, *A. sojae* a *A. awamori* [37, 59].

Aspergillus produkuje dvě formy aspergillopepsinu a to I a II. *Apn II* je proteasa nepepsinového typu, která dále popisována nebude. *Apn I* je proteasou pepsinového typu. Strukturně se jedná o monomerní protein o celkové molekulové hmotnosti 34,3 kDa s 325 aminokyselinovými zbytky kódujícími vlastní protein. Molekula *Apn I* dále obsahuje 20 aminokyselin signální sekvence a 49 aminokyselin propeptidu. Aminokyselinová sekvence *Apn I* je z 32 % podobná lidskému pepsinu. Pomocí dvou cysteinů v aminokyselinové sekvenci vytváří jediný disulfidový můstek. V aktivním místě jsou dva zbytky kyseliny asparagové Asp32 a Asp214 [59].

Aspergillopepsin spolu s rhizopuspepsinem byly mezi prvními zkoušenými proteasami ve vodík/deuteriové výměně po pepsinu [6]. *Apn* přednostně štěpí za hydrofobními zbytky v pozicích P₁ a P₁'. V pozici P₁ mírně štěpí za lysinem (K), tato schopnost je využívána k aktivaci trypsinogenu štěpením vazby K6-I7. Dále štěpí, pokud jsou v pozici P₁ zbytky leucinu (L), argininu (R), asparaginu (N) a histidinu (H). V pozici P₁' pak štěpí výrazně před alaninem (A) a leucinem (L) [23, 37].

1.7 Další aspartátové proteasy

1.7.1 Plasmepsin

Plasmepsin (*PM*, EC 3.4.23.39) je produkován parazitem *Plasmodium falciparum*. Plasmepsiny hrají důležitou roli v intra-erytrocytární digesci hemoglobinu (v průběhu asexuální proliferace v erytrocytu) v tropickém onemocnění známém jako malárie [60]. V průběhu digesce je hemoglobin degradován až na volné aminokyseliny, z nichž většina zůstává nevyužita. Na základě tohoto zjištění se usuzuje, že plasmodium odstraňuje hemoglobin z důvodu prostoru v erytrocytu, či z důvodu osmotické stability, protože vývoj parazita zvyšuje permeabilitu membrány červené krvinky [61]. Celkem existuje 10 plasmepsinů. Proces digesce je prováděn v potravní vakuole parazita. Z této vakuoly byly následně izolovány čtyři typy plasmepsinů. Jsou to *PM* I (iniciuje degradační proces [62]), *PM* II, histo-aspartátová proteasa (HAP) a *PM* IV. Všechny čtyři proteasy jsou zapojené v degradaci hemoglobinu. Tyto enzymy patří do pepsinové rodiny aspartátových proteas a jejich sekvence je vysoce homologní (sekvenční identita se pohybuje okolo 70%). *PM* I, II a IV mají v aktivním centru dva zbytky kyseliny asparagové Asp32 a Asp215 a u HAP je Asp32 nahrazen histidinem [60].

Studium plasmepsinů je zajímavé z hlediska hledání ideálního inhibitoru pro léčení malárie. Při inhibici pepstatinem A celá kultura plasmodia zahynula v důsledku nemožnosti degradovat hemoglobin [60]. Právě terapeutickým cílem je inhibice *PM* I, který je zodpovědný za iniciaci celého procesu digesce [62].

Byly zkoušeny plasmepsin II a IV a experimentech HX-MS. Plasmepsin IV při podmínkách vodík/deuteriové výměny byl téměř neaktivní, zatímco plasmepsin II již za těchto podmínek vykazoval aktivitu, menší než měl pepsin [63].

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo:

- 1) Vyprodukovat rekombinantní proteasy nepenthesin I z *Nepenthes gracilis* a rhizopuspepsin z *Rhizopus chinensis*.
- 2) Vyprodukované proteasy renaturovat *in vitro*.
- 3) Provést srovnávací test aktivity za různých podmínek zajímavých z pohledu vodík/deuteriové výměny (vliv pH, teploty a denaturačních a redukčních činidel na enzymovou stabilitu a aktivitu) s připravenými proteasami a komerčně dostupným hovězím pepsinem A a aspergillopepsinem z *Aspergillus saitoi*.
- 4) Všechny čtyři proteasy imobilizovat na polymerní nosič POROS a otestovat jejich použití pro online digesci proteinu v LC MS/MS experimentech.

3 Materiál

3.1 Přístroje

Analytická kolona Jupiter C18	Phenomenex, USA
Analytické váhy AL54-IC	Mettler Toledo, ČR
Automatické pipety	Gilson, Francie
Automatické pipety	Thermo, USA
Centrifuga Avanti J-26 XP	Beckman Coulter, USA
Rotor: JLA 16.250, JA 25.50	
Centrifuga Spectafuge 16M	Sigma-Aldrich, SRN
Centrifuga Universal 320R	Hettich, UK
Rotor: 1619	
Mikrocentrifuga 5415R	Eppendorf, SRN
Centrifugační koncentrátoři Amicon Ultra	Millipore, USA
Dialyzační trubice Spektra/Por	Spektrum Laboratories, USA
Denovix DS-11	Denovix, USA
Hmotnostní spektrometr Apex Qe	Bruker Daltonics, SRN
Hmotnostní spektrometr Ultraflex III	Bruker Daltonics, SRN
HPLC systém LC-20AD	Shimadzu, Japonsko
HPLC systém Agilent 1200	Agilent Technologies, SRN
Magnetická míchačka Stuart CB161	Keison, UK
Magnetická míchačka	Scientifica, UK
Mrazicí box na -80 °C	Revco, USA

Peptidová past (MicroTrap)	Bruker Daltonics, SRN
pH metr Φ200	Beckman Coulter, USA
pH metr Orion 2 Star	Thermo, USA
Předvážky HF-1200G	AND, USA
Souprava pro SDS-PAGE elektroforézu	Bio-Rad, USA
Spektrometr DU-70	Beckman Coulter, USA
Systém na focení gelů G:Box HR	Syngene, UK
Termostat Thermomixer comfort	Eppendorf, SRN
Termostat	Memmert, SRN
Třepačka na Erlenmeyerovy baňky	Gallenkamp Ltd., UK
Ultracentrifuga Optima LE-80K	Beckman Coulter, USA
Ultrafiltrační membrána, 30 000, cellulose	Millipore, USA
Ultrazvuková lázeň Sonorex	Bandelin, SRN
Ultrazvuková sonda Ultrasonic homogenizer 4710	Cole-Parmer Instrum, USA
UV lampa	Uvitec Cambridge, UK
Vakuová odparka Speedvac	Jouan, Francie
Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody MilliQ	Millipore, USA
Multimetr Fluke 179 s teplotní sondou	Fluke, USA
3.2 Komerční sady	
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	Geneaid, Taiwan
High speed Plasmid Mini Kit	Geneiad, Taiwan
Geneaid Plasmid Maxi Kit	Geneaid, Taiwan

3.3 Chemikálie

1,2-bis(dimethylamino)-ethan	Sigma-Aldrich, SRN
2-merkptoethanol	Serva, SRN
Acetonitril	Merck, SRN
Agar	Oxoid, USA
Agarosa	Serva, SRN
Akrylamid	Sigma-Aldrich, SRN
Ampicilin	Jersey Lab Supply, USA
Azid sodný	Sigma-Aldrich, SRN
Bacto-trypton	Oxoid, USA
Bacto-yeast extrakt	Oxoid, USA
Hovězí sérový albumin	Sigma-Aldrich, SRN
3-(cykloakrylamino)-1-propansulfonová kys.	Sigma-Aldrich, SRN
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, SRN
Ethanol	Lachema, ČR
Ethanolamin	Sigma-Aldrich, SRN
Ethidium bromid	Sigma-Aldrich, SRN
Ethylendiamintetraacetát	Sigma-Aldrich, SRN
Glycerol	Lachema, ČR
Glycin	Sigma-Aldrich, SRN
Guanidin	Sigma-Aldrich, SRN
Hydroxid sodný	Lachema, ČR
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid	Sigma-Aldrich, SRN

Isopropanol	Lachema, ČR
Kyanoborohydrid sodný	Sigma-Aldrich, SRN
Kyselina citrónová	Lachema, ČR
Kyselina chlorovodíková	Lachema, ČR
Kyselina trifluoroctová	Fluka, Švýcarsko
N,N'-methylen-bis-akrylamid	Sigma-Aldrich, SRN
Peroxodisíran amonný	Sigma-Aldrich, SRN
POROS AL 20µm	Life technologies, USA
Sacharosa	Lachema, ČR
Sodiumdodecylsulfát sodný	Bio-Rad, USA
Standard molekulových délek	New England Biolabs, USA
Standard pro SDS-PAGE	Serva, SRN
Thiomočovina	Sigma-Aldrich, SRN
Tris(2-karboxyethyl)fosfin	Sigma-Aldrich, SRN
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, SRN
Voda optima LC/MS grade	Thermo, USA

3.4 Enzymy

<i>Hind III</i> endonukleáza	New England Biolabs, USA
<i>Nde I</i> endonukleáza	New England Biolabs, USA
Prasečí pepsin A	Sigma-Aldrich, SRN
Aspergillopepsin (XIII)	Sigma-Aldrich, SRN

3.5 Inhibitory proteas

Leupeptin	Sigma-Aldrich, SRN
-----------	--------------------

Fenylmetylsulfonilfluorid Sigma-Aldrich, SRN

3.6 Vektory

pET3a (+) Novagen, USA

pET21a (+) Novagen, USA

3.7 Bakteriální kmeny

Kompetentní buňky *E. Coli* OverExpress C41(DE3) Lucigene, USA

Kompetentní buňky *E. Coli* BL21-Gold (DE3) Stratagene, USA

Kompetentní buňky *E. Coli* Top10 Life Technologies, USA

3.8 Média

LB médium/agar dle Luria-Bertaniho na 1 litr média: 10 g Bacto-trypton, nebo Bactopepton, 5 g Bacto-yeast extract (kvasničný autolýzát), 10 g NaCl a úprava na pH 7,4 pomocí NaOH a následná sterilizace. V případě LB agaru přidat 15-20 g agaru.

3.9 Roztoky a pufry

5% roztok TCA (w/v): 5 g TCA rozpuštěných v 95 ml destilované vody

Akrylamidová směs pro přípravu SDS-PAGE: 29% (w/v) akrylamid,
1% (w/v) N,N'-methylen-bis-akrylamid

Barvicí roztok pro SDS-PAGE: 45% (v/v) methanol; 10% (v/v) kys. octová; 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

Denaturační pufr (renaturace proteinu): 8M močovina, 50mM CAPS pH 10,5,
1mM EDTA, 1mM glycin, 500mM NaCl, 300mM 2-merkaptoethanol

Dialyzační pufr 1: 50mM Tris-HCl pH 11,0

Dialyzační pufr 2: 50mM Tris-HCl pH 7,5

Elektrodový pufr: 10mM Tris-HCl, 250mM glycin, 0,1% SDS, pH 8,3

Fosfátový pufr (dialyzační pufr 3): 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄,
2mM KH₂PO₄, pH 7,4

Glycinový pufr pH 2,5 o různé koncentraci

MALDI: 100mM uhličitán triethylamonný pH 9,0 nebo 0,5% kyselina mravenčí

MALDI matrice: kyselina 4-hydroxy-3,5-kyanoskořicová, nasycený roztok v 50% acetonitrilu namíchaném s využitím 100mM uhličitanu triethylamonného pH 9,0 nebo 0,5% kyseliny mravenčí.

McIlvainův pufr: 0,1M roztok kyseliny citrónové a 0,2M roztok Na_2HPO_4 v daném poměru pro příslušné pH

NEB 2 pufr

New England Biolabs, USA

Odbarvovací roztok pro gely z SDS-PAGE: 35% ethanol, 10% kyselina octová

Promývací pufr (izolace inkluzních tělísek): 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM 2-merkaptioetanol, 1mM NaN_3 , pH 7,4

Pufr s detergentem (izolace inkluzních tělísek): 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1mM 2-merkaptioethanol, 1mM NaN_3 , pH 7,4

Sacharózový lyzační pufr (izolace inkluzních tělísek): 25% (w/v) sacharóza, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM NaN_3 , pH 7,4

SDS-PAGE pufr: 10mM Tris-HCl, 250mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3

TAE pufr: 2M Tris-HCl, 1M kyselina octová, 50mM EDTA, pH 8,0

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE (redukující): 50mM Tris-HCl, 12% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) bromfenolová modř, 100mM DTT, pH 6,8

Zastavovací pufr 1 (imobilizace): 120 μl ethanolaminu, 50 μl 2M NaBH_3CN , 400mM Tris-HCl pufr, doplnit na 1 ml, pH 7,3

Zastavovací pufr 2 (imobilizace): 120 μl ethanolaminu, 50 μl 2M NaBH_3CN , 400mM glycinový pufr doplnit na 1 ml, pH 5,0

4 Metody

4.1 Molekulárně biologická část

4.1.1 Transformace kompetentních buněk

Produkční vektor pET3a(+) s genem pro rhizopuspepsin (*R. chinensis*) byl připraven Dr. Jordanem Tangem (University of Oklahoma), a vektor pET21a(+) s genem pro nepenthesin I (*N. gracilis*) byl připraven Dr. Hynkem Mrázkem z plasmidu zaslaného prof. Takahashi z Tokijské univerzity.

Byly připraveny agarové misky rozpuštěním 100 ml LB agaru na vařiči. Do kapalného agaru byl přidán ampicilin do finální koncentrace 0,1mM. Nalité plotny se nechaly ochladit. Kompetentní buňky TOP 10 (klonovací), skladované na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, byly umístěny na led na 30 minut.

K buňkám byl přidán produkční vektor pET3a(+) ($c = 1\text{ }\mu\text{g/ml}$) a pET21a(+) ($c = 0,38\text{ }\mu\text{g/ml}$) vždy tak, aby výsledná koncentrace v buněčné suspenzi byla $1\text{ }\mu\text{g/ml}$. Inkubace při laboratorní teplotě, bez třepání, trvala 40 minut.

Transformace kompetentních buněk byla provedena tepelným šokem. Buněčná suspenze o objemu 0,1 ml byla na 45 vteřin umístěna do termostatu o teplotě $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po teplotním šoku byly buňky přemístěny zpět na led, byl k nim přidán 1 ml čerstvého média bez antibiotik a následně byly inkubovány hodinu při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dále byla buněčná kultura centrifugována 3 minuty při $3\,400\times g$.

Buněčná kultura byla koncentrována odebráním části supernatantu. Ve zbylém supernatantu byly buňky dále resuspendovány. Následně bylo nanášeno $30\text{ }\mu\text{l}$ buněčné suspenze na připravené agarové plotny. Po vsáknutí buněčné suspenze na agar byly poté plotny otočeny dnem vzhůru a nechány inkubovat 1 den při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.2 Minipreparace DNA a ověření insertu pomocí restrikčního štěpení

Izolované kolonie, které přes noc narostly na agarové plotně, byly vypíchnuty sterilním párátkem a přeneseny do zkumavek s připraveným LB médiem s 0,1mM ampicilinem. Bylo připraveno vždy alespoň 6 zkumavek (každá s izolovanou kolonií). Zkumavky byly ponechány ve třepačce (300 ot/min) přes noc při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (tzv. noční kultury).

Pro izolaci DNA byl použit High-speed Plasmid MiniKit a postup byl proveden dle přiloženého protokolu. DNA byla eluována 50 μ l destilované vody.

Z izolované DNA byla část použita pro restrikční analýzu. Celkový objem reakce byl 10 μ l. Z toho bylo 8,4 μ l izolované DNA, 1 μ l štěpného pufru (*NEB 2*, 10 \times), 0,3 μ l restrikčních endonukleas *Nde I* (20 000 U/ml) a *Hind III* (20 000 U/ml).

4.1.3 Agarosová elektroforéza

Pro kontrolu vzorků z PCR, nebo po restrikčních reakcích byl používán 1% agarosový gel, který byl připraven z 0,5 g agarosy a 50 ml TAE pufru (1 \times koncentrovaný). Po zahřátí a zchladnutí agarosy bylo do Erlenmeyerovy baňky spolu s rozpuštěnou agarosou přidáno 2,5 μ l ethidium bromidu (finální koncentrace 740 μ g/ml), který se váže do molekul DNA a pomáhá tak vizualizovat DNA pod UV světlem. Pro srovnání velikostí úseků DNA, byly použity 1 kb a 0,1 kb standardy. Horizontální elektroforéza byla prováděna v TAE pufru při konstantním napětí 4,5 V/cm.

4.1.4 Maxipreparace DNA

Klony bakterií, které obsahovaly požadovaný gen (ověřeno dle postupu kap. 4.1.2-3), byly přeočkovány (100 μ l) z nočních kultur do 250 ml LB média (v jednolitrové Erlenmeyerově baňce) s 0,1mM ampicilinem. Kultury byly ponechány třepat (220 ot/min) přes noc při 37 °C.

Noční kultury (250 ml) byly převedeny do centrifugačních kyvet. Buněčná suspenze byla centrifugována 30 minut při 3 000 \times g. Supernatant byl odebrán a peleta byla použita pro následnou extrakci plasmidové DNA. Pro extrakci byl použit Plasmid Maxi kit a bylo postupováno dle přiloženého protokolu výrobce. Precipitovaná DNA v isopropanolu byla centrifugována 20 minut při 13 000 \times g a 4 °C. Supernatant byl odebrán. K peletě bylo přidáno 5 ml 70 % etanolu tak, aby se opláchly stěny kyvety, na kterých byla vysrážená DNA a peleta se v ethanolu resuspendovala. Kyveta s rozpuštěnou DNA byla znova centrifugována 30 minut při 13 000 \times g a 4 °C. Supernatant byl odebrán a peleta byla vysušena a následně byla rozpuštěna ve vhodném objemu TE pufru, nebo ddH₂O.

4.1.5 Stanovení koncentrace izolované DNA

Vzorek DNA byl naředěn 100 \times , tj. 4 μ l DNA a 396 μ l destilované vody. Absorpční spektra vzorků byla měřena spektrofotometrem DU-70 v blízké UV oblasti. Pokud je poměr $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ roven 1,8, jedná se o velmi čistý vzorek DNA. Přibližná koncentrace DNA byla

určena pomocí empirického vztahu, že jednotkové absorbanci při 260 nm odpovídá koncentrace 50 µg/ml DNA.

Výpočet přibližné koncentrace byl proveden dle následující rovnice:

$$c_{\text{přibližná}} = A_{260} \times 50 \times R \quad (4.1)$$

A_{260} je naměřená absorbance při 260 nm a R značí, kolikrát byl vzorek naředěn.

4.1.6 Transformace kompetentních buněk - produkční kmeny

DNA z předchozího separačního kroku (kapitola 4.1.4) byla použita pro transformaci kompetentních buněk *E. coli* kmenů Gold a C41. Postup byl stejný jako v kapitole 4.1.1. Plasmidovou DNA s genem pro ***Rpn*** byly transformovány buňky Gold (0,5 µl). Dále byly transformovány buňky C41 plasmidovou DNA s genem pro ***Rpn*** (0,5 µg/ml DNA) a pro ***Nep I*** (0,25 µg/ml DNA).

4.1.7 Test produkce proteinů

Z narostlých agarových misek po transformaci byly vybrány vždy 3 kolonie, které byly vypíchnuty sterilním párátkem a přeneseny do zkumavek s 3 ml LB média s příslušnými antibiotiky (0,1mM ampicilin, 12,5 µg/ml tetracyklin). Pro buňky C41 byl použit ampicilin a pro buňky Gold kombinace ampicilinu a tetracyklinu. Zkumavky byly dány na noc do kultivační místnosti (37 °C) za současného třepání (300 ot/min).

Z nočních kultur bylo odebráno 2×20 µl do dvou zkumavek se 2 ml LB média bez antibiotik. Kultury byly ponechány třepat při 37 °C a průběžně byla měřena optická densita při vlnové délce 550 nm (OD_{550}). Když absorbance vzorku při dané vlnové délce dosáhla přibližně hodnoty 0,6, byla v polovině kultur indukována exprese cílových proteinů přidavkem induktoru IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid).

Výsledná koncentrace IPTG ve zkumavkách s buňkami nesoucí gen pro ***Rpn*** byla 1,25mM a pro ***Nep I*** 1mM. Po 4 hodinách byla produkce ukončena, buněčné kultury byly přeneseny do kyvet a centrifugovány 30 minut 13 900×g. Supernatant i peleta byly uschovány v mrazicím boxu při – 20 °C. Peleta byla resuspendována ve 130 µl 1× vzorkového pufru (s 100mM DTT) pH 6,8. Vzorky byly přeneseny do mikrozkušavek a vařeny po dobu 5 minut, centrifugovány 10 minut při 11 400×g a poté analyzovány pomocí SDS elektroforézy.

4.1.8 Polyakrylamidová elektroforéza v prostředí SDS

Pro analýzu proteinů pomocí SDS-PAGE (polyakrylamidová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného) byl připraven 5% zaostřovací gel a 12% separační gel dle následujícího rozpisu:

Tabulka 4-1: Složení gelů pro elektroforetické dělení proteinů

Složka směsi	Objem [ml]	
	12% separační gel (5 ml)	5% separační gel (1ml)
H ₂ O	1,6	0,68
30% akrylamid mix	2,0	0,17
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,3	–
1,0 M Tris-HCl pH 6,8	–	0,13
10 % SDS	0,05	0,01
10 % APS	0,05	0,01
TEMED	0,002	0,001

Byl použit standard známých molekulových hmotností. Použité napětí bylo 9 V/cm.

4.2 Exprese a renaturace proteinů

4.2.1 Velkoobjemová produkce proteinu

Proteasy, v množství nezbytném pro enzymovou charakterizaci a využití pro digesti proteinů v HX-MS experimentech, byly získány velkoobjemovou produkcí. Do Erlenmeyerových baněk, o objemu 2 litry, bylo odměřeno po 500 ml LB média (pro dostatečnou aeraci).

Médium bylo očkováno 0,5 - 1 ml noční kultury s produkčními kmeny (buňky C41 pro *Nep I*, buňky Gold pro *Rpn*). Buňky byly kultivovány při 37 °C za současného třepání (220 ot/min). Po dvou hodinách byla kontrolována optická densita při vlnové délce 550 nm. Když OD₅₅₀ dosáhla hodnoty 0,6, byl přidán induktor IPTG (*Nep I* - výsledná koncentrace 1mM, *Rpn* - výsledná koncentrace 1,25mM). Produkce trvala celkem 4 hodiny. Poté byly buňky sklizeny (centrifugace 30 minut při 13 900×g) a použity pro izolaci inkluzních tělísek.

4.2.2 Izolace inkluzních tělísek

Buněčná peleta z předchozího kroku (kap. 4.2.1) byla rozpuštěna v sacharosovém pufru (20 ml na 1 litr produkčního média). Byly přidány inhibitory proteas leupeptin (1 μ M) a PMSF (1mM). Suspenze byla 4 krát zmrazena na -80°C a rozmrazována na vodní lázni s teplotou 40°C .

Na 20 ml sacharosového pufru bylo přidáno 400 μ l 1M MgCl_2 , 3 μ l DNAsy I (100 U/ μ l) a 5 μ l RNAsy I (10 mg/ml). Celá směs byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. Suspenze byla sonikována 5 \times 30 vteřin na ledu s přestávkami (30 vteřin), aby se směs nezahřívala. Roztok byl centrifugován 15 minut při 4°C a 10 000 $\times g$.

Bylo provedeno postupné promytí pelety nejprve tritonovým pufrům (20 ml na 1 litr produkčního média) a poté promývacím pufrům (10 ml na 1 litr produkčního média), za současného sonikování. V obou krocích byly před sonikací přidány inhibitory proteas (leupeptin, PMSF) a roztoky byly centrifugovány 15 minut 10 000 $\times g$ při 4°C . Peleta byla uschována při -80°C .

Kyvety s inkluzními tělisky byly zváženy a od hodnoty byly odečteny váhy prázdných kyvet. Hmotnost získaných inkluzních tělísek je důležitá pro následnou renaturaci proteinu *in vitro*.

4.2.3 Renaturace proteinu *in vitro*

Inkluzní těliska byla rozpuštěna v denaturačním pufru (8M močovina, 50mM CAPS pH 10,5, 1mM EDTA, 1mM glycin, 500mM NaCl, 300mM 2-merkptoethanol) v poměru 1 mg inkluzních tělísek na 1 ml pufru. Po jedné hodině inkubace při laboratorní teplotě (21°C) byl roztok zbaven nerozpustných částí centrifugací (50 000 $\times g$, 30 minut, 4°C). Roztok denaturovaného proteinu byl v dialyzačních trubicích (Cellulose membrane, 33 mm) dialyzován proti pětinasobnému objemu 50mM Tris-HCl pufru pH 11 po dobu jedné hodiny. Poté byl dialyzační pufr vyměněn za čerstvý a dialýza pokračovala za stejných podmínek. Dále byl dialyzační pufr vyměněn za 50mM Tris-HCl pH 7.5 a dialýza probíhala po dobu 12 hodin při 4°C . Poslední dialýza byla provedena proti fosfátovému pufru pH 7.5 po dobu 24 hodin při 4°C .

Dialyzovaný vzorek proteinu byl centrifugován (24 000 $\times g$, 30 minut, 4°C), aby byl odstraněn vzniklý precipitát a protein byl následně koncentrován pomocí koncentrační cely (Ultrafiltrační cely Amicon) s 30 kDa ultrafiltrační membránou a centrifugačních

koncentrátů (Mr 10 000). Nakonec byl roztok centrifugován (24 000×g, 30 minut, 4 °C) a supernatant byl uchován při 4 °C.

4.2.4 Stanovení koncentrace pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA)

Dle pokynů výrobce byl připraven pracovní roztok smísením roztoku modré skalice a roztoku kyseliny bicinchoninové v 0,1M NaOH v poměru 1:50 (CuSO₄:BCA, v/v). Byla též připravena kalibrační řada BSA o různých koncentracích (2,0; 1,5; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 a 0 mg/ml). Ke 4 µl vzorku (nebo standardu) bylo pipetováno 80 µl pracovního roztoku a reakční směs byla lehce promíchána na vortexu a ponechána inkubovat ve vodní lázni při 37 °C po dobu 30 minut. Po 30 minutách byly roztoky z lázně vyjmuty. Byla měřena absorbance roztoků na spektrofotometru DeNovix při vlnové délce 562 nm.

4.2.5 Ověření proteinů po renaturaci pomocí MALDI-TOF MS

Po renaturaci bylo provedeno ověření získaných proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Byla změřena molekulová hmotnost preparátu před a po aktivaci okyselením. Jeden mikrolitr roztoku proteinu byl smíchán s 1 µl 100mM uhličitany triethylamonného pH 9,0 nebo s 1 µl 0,5% kyseliny mravenčí. Následně bylo 0,5 µl nanášeno na MALDI destičku a smícháno s 0,5 µl kyseliny 4-hydroxy-3,5-kyanoskořicové (MALDI matrice). Ta byla připravena jako nasycený roztok v 50% acetonitrilu namíchaném s využitím 100mM uhličitany triethylamonného pH 9,0 nebo 0,5% kyseliny mravenčí. Analýza byla provedena na přístroji Ultraflex III v lineárním módu. Kalibrace byla provedena na známé proteiny (Protein Calibration Mix II) a rozsah měření byl od 10 kDa do 50 kDa. Data byla zpracována pomocí programu mMass [64].

4.3 Závislost aktivity proteas na experimentálních podmínkách

4.3.1 Zkouška aktivity enzymu

Aktivita enzymu byla zkoušena se substrátem hemoglobinem (dále jen Hb) po reakční dobu 15 minut dle metodiky zavedené v laboratoři [25].

Nejprve byl připraven roztok substrátu, hemoglobinu (není-li uvedeno jinak), o koncentraci 20 mg/ml tak, že navážené množství bylo rozpuštěno ve 200 µl destilované vody a následně bylo přidáno 800 µl 1M glycinového pufru pH 2,5 a roztok byl krátce sonikován.

Do mikrozkuřavky bylo pipetováno 25 µl 20 mg/ml roztoku substrátu a roztok byl inkubován po dobu 5 minut při 37 °C. K temperovanému roztoku substrátu bylo přidáno 5 µl

roztoku proteasy (o koncentraci 1 mg/ml), která se následně inkubovala se substrátem po dobu 15 minut. Reakce byla ukončena přidáním 50 μ l 5 % (w/w) roztoku trichloroctové kyseliny (TCA). V případě kontrolních vzorků, byl jako první přidán roztok TCA a až následně roztok proteasy. Celá směs byla zamíchána na vortexu a poté byla ještě 5 minut ponechána v lázni při teplotě 37 °C. Mikrozkušavky s reakční směsí byly centrifugovány při 16 100 \times g po dobu 10 minut. Aktivita proteas byla měřena spektrofotometrem DeNovix DS-11 sledováním absorpance neprecipitovaných peptidů při 280 nm.

4.3.2 Závislost aktivity na teplotě

Metodou dle 4.3.1 byla zkoumána aktivita proteas při teplotách 0, 4, 10, 15, 21 a 37 °C. Teplota 0 °C byla připravena vytvořením lázně o složení voda-led. Ostatní lázně byly připraveny z teplé vody a teplota byla upravována pomocí ledu, který byl do lázně zamíchán. Teplota všech lázní byla průběžně sledována multimetrem s teplotním čidlem.

4.3.3 Závislost aktivity na pH

Metodou 4.3.1 byl zkoumán vliv reakčního pH na aktivitu. Reakčním prostředím byly McIlvainovy citráto-fosfátové pufrы o pH 2,2; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 a substrátem byl hovězí sérový albumin. Pufrы byly připraveny smícháním příslušného množství 0,1M roztoku kyseliny citrónové s 0,2M roztokem Na₂HPO₄. Pro pH 1,0 byl připraven 100mM glycinový pufr.

4.3.4 pH stabilita

Byla zkoumána pH stabilita jednotlivých proteas v pH 4, 5, 6, 7 a 8 metodou uvedenou v kapitole 4.3.1 při 4 a 21 °C. Byla stanovována zbytková aktivita enzymů za pH optima se substrátem hemoglobinem na začátku pokusu a následně po jednom a sedmi dnech inkubace.

4.3.5 Vliv denaturačních a redukčních činidel

Vliv denaturačních a redukčních činidel na aktivitu proteas byl testován spektrofotometricky metodou uvedenou v kapitole 4.3.1. Denaturačními činidly byly zvoleny 0, 0,75, 1,5, 3,0, a 6,0M močovina, a guanidin v 0,5M glycinovém pufru pH 2,5. Pokus byl prováděn ve dvou sadách s a bez 0,1M TCEP. Nejprve byly substrát a proteasa temperovány v denaturačním činidle ve vodní lázni po dobu 15 minut při 37 °C. Poté byla

proteasa přidána k substrátu a reakce byla ponechána ve vodní lázni dalších 15 minut. Dále bylo postupováno dle metody 4.3.1.

4.4 Imobilizace proteas a MS

4.4.1 Gelová filtrace

Pro gelovou filtraci byly použity minikolony GE Healthcare PD-10. Byl připraven 50mM MOPS pH 7,0, který slouží jako eluční pufr pro nepenthesin (pH bylo upraveno zředěnou H_2SO_4) a dále 50mM citronan sodný pH 5,0 (titrován HCl) pro rhizopuspepsin, pepsin a aspergillopepsin.

Kolona byla ekvilibrována 20 ml příslušného pufru, následně bylo naneseno 2,5 ml roztoku **Nep I** (23.95 mg/ml), **Rpn** (15,5 mg/ml), **Apn** (55 mg/ml). Prasečí pepsin je dodáván ve vysoké čistotě a tak jej lze rozpustit přímo v požadovaném pufru a nevyžaduje tento purifikační krok. Protein byl eluován celkem 3,5 ml příslušného pufru do 15 ml zkumavky typu Falcon. V získaných preparátech byla stanovena koncentrace proteinu pomocí metody 4.2.4.

Získaný objem (3,5 ml) z předchozího kroku byl dále koncentrován centrifugací ($5\,000\times g$) na centrifugačních koncentrátorech ($M_r\,10\,000$) tak, aby výsledná koncentrace proteasy byla 45 mg/ml. Koncentrace byla znova zkontrolována pomocí metody 4.2.4.

4.4.2 Imobilizace proteas

Byl odvážen nosič POROS-20AL (2,5 mg nosiče na 1 mg proteinu) do 15 ml zkumavek typu Falcon. Dále byly přidány roztoky proteas o koncentraci 45 mg/ml a zkumavky byly jemně míchány převrácením po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo za současného míchání každou minutu přidáváno 30 μl 2M Na_2SO_4 (v příslušném pufru, celkem 300 μl) a posléze byl síran přidáván do dosažení finální koncentrace 1 M v krocích po 50 μl . Byl přidán 2M NaBH_3CN tak, aby jeho finální koncentrace byla 83mM a dobře uzavřené zkumavky byly míchány přes noc v zapnuté digestoři při laboratorní teplotě.

Druhý den byl do reakční směsi přidán zastavovací pufr (100mM NaBH_3CN ve 2M ethanolaminu a 400mM Tris-HCl pH 7,3) tak, že bylo dáno 600 μl zastavovacího pufru na 1 875 μl obsahu zkumavky, čímž byla imobilizace ukončena. Po přidavku zastavovacího pufru byla reakce míchána další 2 hodiny. Jelikož proteasy pepsin a aspergillopepsin jsou

ireverzibilně inhibovány při hodnotách pH vyšších než 6, bylo při jejich imobilizaci využito jako zastavovacího roztoku 400mM citronanu sodného pH 5,5 s 2M ethanolaminem.

Suspenze byla krátkou centrifugací, (5 minut při 1 000×g a 4 °C) promyta 2×10 ml 50mM citrátového pufru pH 5,5 s 1M NaCl a 5×10 ml 50mM glycinového pufru pH 2,5. Imobilizované proteasy byly dlouhodobě uchovávány při 4 °C jako 50% suspenze v 50mM glycinovém pufru pH 2,5.

4.4.3 Plnění kolon

Nejprve byly všechny části nerezové kolony (2×20 mm, IDEX) sonikovány 15 minut v methanolu. Poté byla prázdná kolona na jednom konci uzavřena fritou a na druhém byl ponechán volný průtok. Do kolony byla pomocí mikrostříkačky a připojené polymerní hadičky naplněna suspenze nosiče POROS 20-AL s imobilizovanou proteasou. Následně bylo plnění dokončeno pomocí LC pumpy LC-20AD. Hadička byla odpojena, a kolona z obou stran uzavřena fritou. Poté byla kolona hodinu promývána průtokem 0,4% kyseliny mravenčí.

4.4.4 On-line digesce proteinu a MS analýza

Systém pro analýzu sestával ze vstupního a přepínacího ventilu, mezi kterými byla odsolovací peptidová past (peptide MicroTrap), z analytické kolony (0,5×50 mm, Jupiter C18, 5μm, 300Å) a z kolony s imobilizovanou proteasou. Pro dodržení přesných experimentálních podmínek používaných v HX-MS experimentech byly ventily, kolony a peptidová past chlazeny ponořením v lázni voda-led.

Modelový protein (myoglobin) byl nejprve přes vstupní ventil nastříknut do plnicí smyčky. Následně byl ventil otočen tak, aby plnicí smyčkou protékala mobilní fáze (0,4% kyselina mravenčí ve vodě, průtok 100 μl/min). Protein prošel kolonou s imobilizovanou proteasou, kde byl štěpen. Vzniklé peptidy byly zachyceny v peptidové pasti, kde byly následně odsoleny promytím 0,4% kyselinou mravenčí, za stejného průtoku (100 μl/min).

Po uplynutí 4 minut od nástřiku byl otočen druhý ventil tak, aby peptidová past byla zařazena do průtoku z druhého HPLC (Agilent Technologies 1200). Peptidy byly z pasti uvolněny a následně separovány na analytické koloně Jupiter C18 s reverzní fází užitím lineárního gradientu 5-35% (v/v) roztoku B po dobu 30 minut, následované gradientem do 95% (v/v) roztoku B po dobu 1 minuty při průtokové rychlosti 15 μl/min. Použitými

rozpouštědly roztok A (0,4% kyselina mravenčí a 2% acetonitril ve vodě) a roztok B (0,4% kyselina mravenčí v 95% acetonitrilu).

Výstup analytické kolony byl přímo připojen k ionizačnímu zdroji (ESI) hmotnostního spektrometru Apex-ULTRA Qe (Bruker Daltonics), využívajícího princip iontové cyklotronové rezonance spojené s Fourierovou transformací (zkráceně FT-ICR MS), který byl vybaven 9,4 T supravodivým magnetem. ESI-FTICR MS byl externě kalibrován pomocí argininových klastrů.

Přístroj pracoval v data-dependentním módu, kdy z každého MS skenu, vybral 6 nejintenzivnějších iontů a ty následně byly podrobeny MS/MS analýze pomocí kolizně indukované disociace v kvadrupólu. Data byla zpracována programem DataAnalysis 4.0 a výsledky byly použity pro hledání v programu MASCOT (MatrixScience) proti databázi obsahující pouze sekvenci myoglobinu a proti databázi obsahující vybrané aspartátové proteasy (kontrola možné autolýzy).

Pro vizualizaci sekvenčního pokrytí byly identifikované peptidy vyneseny proti sekvenci myoglobinu pomocí nástroje Draw Map dostupného na webových stránkách MS Tools [65].

5 Výsledky

5.1 Úvod k výsledkům

Aminokyselinové sekvence všech čtyř proteas jsou uvedeny v příloze této práce. Údaje byly získány z databáze UniProt [66]. V aminokyselinových sekvencích jsou zvýrazněny signální peptidy, propeptidy, aktivní místa, aminokyselina lysin (K) důležitá pro imobilizaci, dále cysteiny, které tvoří disulfidové můstky a potencionální glykosylační místa, pokud daná proteasa nějaká má.

5.2 Příprava plasmidů kódujících rhizopuspepsin a nepenthesin I

Dle metody 4.1.1 byly transformovány kompetentní buňky *E.coli* TOP10 produkčními vektory pET3a(+)-*Rpn* a pET21a(+)-*Nep I*. Z těchto buněk byl poté izolován plasmid vysoké čistoty, který byl následně dle metody 4.1.2 testován pomocí restriční analýzy na přítomnost příslušných insertů.

Restriční analýza potvrdila přítomnost insertů ve všech testovaných klonech (obrázek není ukázán). Tyto klony byly použity k zaočkování 250 ml LB média pro následnou maxipreparaci DNA (metoda 4.1.4). Po maxipreparaci DNA, byla dle metody 4.1.5 stanovena čistota a teoretická koncentrace získané koncentrované plasmidové DNA.

5.2.1 Měření čistoty a koncentrace DNA

Z izolované plasmidové DNA byly odebrány 4 μ l a vzorek byl 100 \times naředěn pomocí destilované vody. Následně bylo provedeno spektrofotometrické měření na přístroji DU-70 (Beckman). Podle získaných údajů, viz tabulka 5-1, při vlnových délkách 260 a 280 nm byl vypočten poměr $\lambda_{260}/\lambda_{280}$. Z tabulky 5-1, je patrné, že byla získána velmi čistá plasmidová DNA. Následně byla vypočítána přibližná koncentrace DNA podle rovnice 1 (kapitola 4.1.5). Bylo získáno 23,9 μ g pET21a(+)-*Nep I* a 31.6 μ g pET3a(+)-*Rpn*.

Tabulka 5-1: Měření čistoty a koncentrace plasmidové DNA po maxipreparaci DNA pomocí spektrofotometrie.

Plasmid	λ_{260}	λ_{280}	$\lambda_{260} \setminus \lambda_{280}$	C _{DNA} [μ g/ml]
pET21a(+)- <i>Nep I</i>	0,0955	0,0530	1,801	477,5
pET3a(+)- <i>Rpn</i>	0,1266	0,0709	1,785	633,0

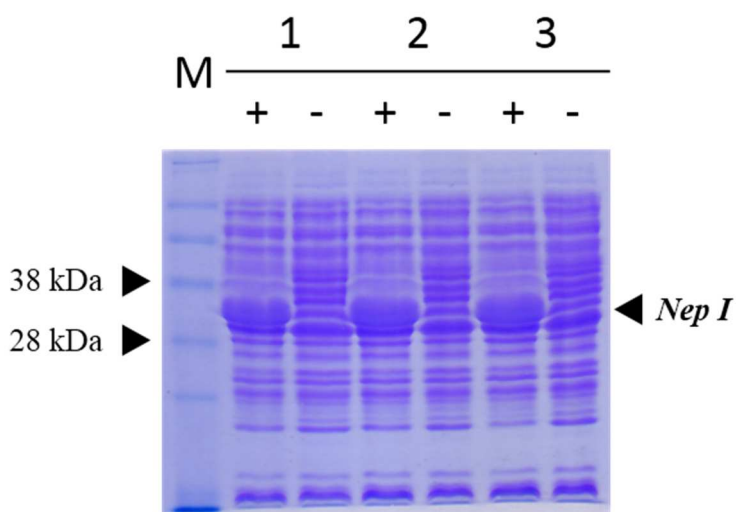
5.2.2 Test produkce proteinů

Izolovanou plasmidovou DNA, o známé koncentraci a čistotě, byly pomocí techniky tepelného šoku (metoda 4.1.6) transformovány produkční kmeny *E.coli*, a to buňky C41 a buňky Gold. Produkční vektor s ***Rpn*** byl vložen do buněk Gold a zároveň do buněk C41. Vektor s ***Nep I*** byl vložen pouze do buněk C41, o kterých bylo známo, že daný protein exprimují velmi spolehlivě.

Z transformovaných nočních kultur bylo pak následně dvakrát odebráno 20 μ l kultury a přeneseno do nových zkumavek s LB médiem (metoda 4.1.7). Každý klon byl v nesen do dvou zkumavek. V jedné byla prováděna indukce IPTG (výsledná koncentrace IPTG byla 1mM a 1,25mM pro ***Nep I***, resp. ***Rpn***), druhá byla ponechána bez indukce. Po ukončení produkce byla provedena SDS elektroforéza v redukujícím prostředí (metoda 4.1.8).

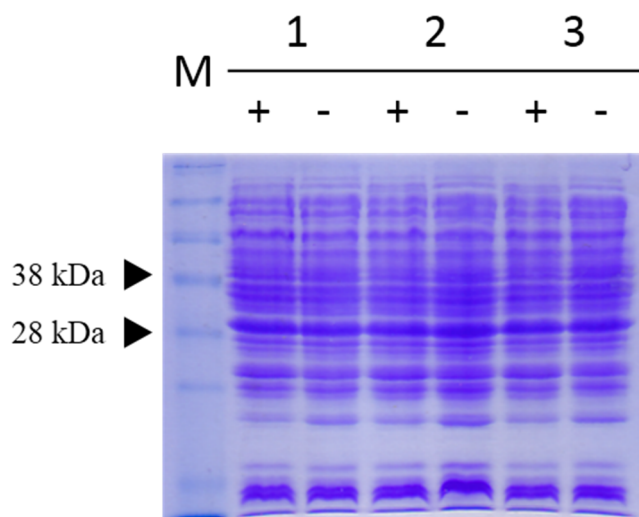
Na obrázcích 5-1 až 5-3, strana 47-48, jsou ukázány SDS elektroforeogramy produkci jednotlivých proteinů v daných typech kmenů *E.coli*. Symbol M značí standard známých molekulových hmotností.

Elektroforeogram úspěšné produkce ***Nep I***, obrázek 5-1, v buňkách C41.



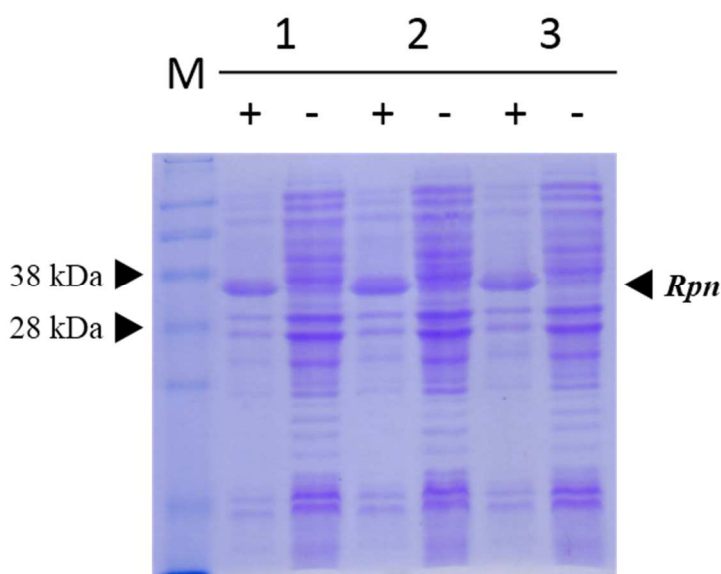
Obr 5-1: Produkce *Nep I* v buňkách C41. Symbolem M je označen standard známých molekulových hmotností, + označuje buňky indukované 1mM IPTG a - buňky neindukované. Čísla označují různé klony buněk C41. Šipka ukazuje pozici odpovídající mobilitě produkovaného proteinu.

Na obrázku 5-2 je ukázán elektroforeogram produkce **Rpn** v buňkách C41. Nejsou zde vidět žádné rozdíly mezi indukovanou a neindukovanou drahou, které by naznačovaly, že buňky C41 produkovaly **Rpn**. Z toho vyplývá, že buňky C41 jsou pro produkci **Rpn** nevhodné.



Obr 5-2: Neúspěšná produkce Rpn v buňkách C41. Symbolem *M* je označen standard známých molekulových hmotností, + označuje buňky indukované 1,25mM IPTG a - buňky neindukované (kontrola.) Čísla označují různé klony buněk C41.

Na obrázku 5-3 je elektroforeogram produkce **Rpn** v buňkách Gold. Z pozice viditelných pruhů v indukovaných drahách vyplývá, že buňky Gold produkují **Rpn**.



Obr 5-3: Produkce Rpn v buňkách Gold. Symbolem *M* je označen standard známých molekulových hmotností, + označuje buňky indukované 1,25mM IPTG a - buňky neindukované. Čísla označují různé klony buněk Gold. Šipka ukazuje pozici odpovídající mobilitě produkovaného proteinu.

5.3 Exprese a renaturace proteinů

Poté co byly zjištěny podmínky produkce pro **Nep I** a **Rpn**, byla provedena velkoobjemová produkce a renaturace.

5.3.1 Renaturace proteinů *in vitro* včetně optimalizace

Velkoobjemová produkce (metoda 4.2.1) začala přeočkováním pozitivních (ověřených testem produkce) nočních kultur do 500 ml LB média ve dvou litrové Erlenmeyerově baňce. Celkem bylo zaočkováno po jednom a půl litru LB média pro každý protein. V průběhu kultivace byla sledována OD₅₅₀ a po dosažení hodnoty 0,6 byl přidán induktor IPTG do finální koncentrace 1mM (**Nep I**) a 1,25mM (**Rpn**). Na konci produkce byly buňky sklizeny centrifugací. Izolace inkluzních tělísek byla provedena metodou 4.2.2.

Výsledkem izolačního protokolu bylo celkem 1,84 g inkluzních tělísek s proteinem **Nep I** a 1,09 g s proteinem **Rpn**. Množství inkluzních tělísek odpovídajících produkci z půl litru LB média bylo použito pro vyzkoušení optimalizace renaturačního protokolu.

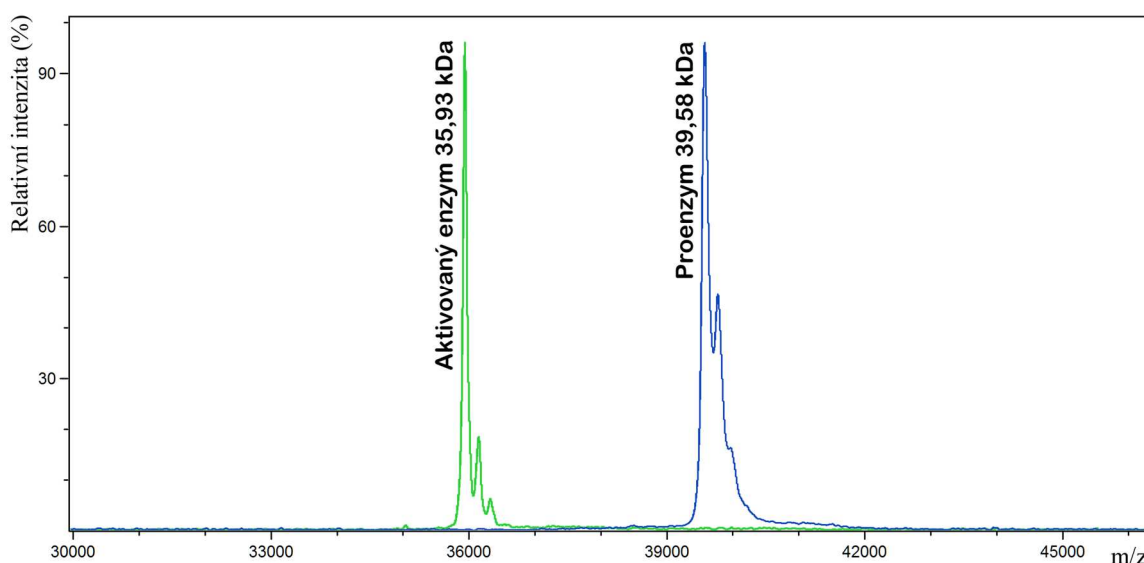
V renaturačním protokolu (metoda 4.2.3) bylo postupováno následovně: Podle klasického přístupu na 1 mg inkluzních tělísek bylo použito 1 ml renaturačního pufru a podle optimalizovaného protokolu na 10 mg inkluzních tělísek byl použit 1 ml renaturačního pufru.

Po renaturaci *in vitro* následovalo zjištění koncentrace proteinů pomocí BCA (metoda 4.2.4). Renurací podle klasického protokolu bylo získáno 84,4 mg **Nep I** a 42 mg **Rpn** z 1 litru buněčné kultury. Optimalizovaný protokol poskytl výtěžky nižší o 71,2 % pro **Nep I** a o 21,4 % pro **Rpn**. Z toho vyplývá, že optimalizovaný protokol není vhodný pro žádnou produkovanou proteasu, i když v případě **Rpn** nebyl pokles ve výtěžku tak vysoký.

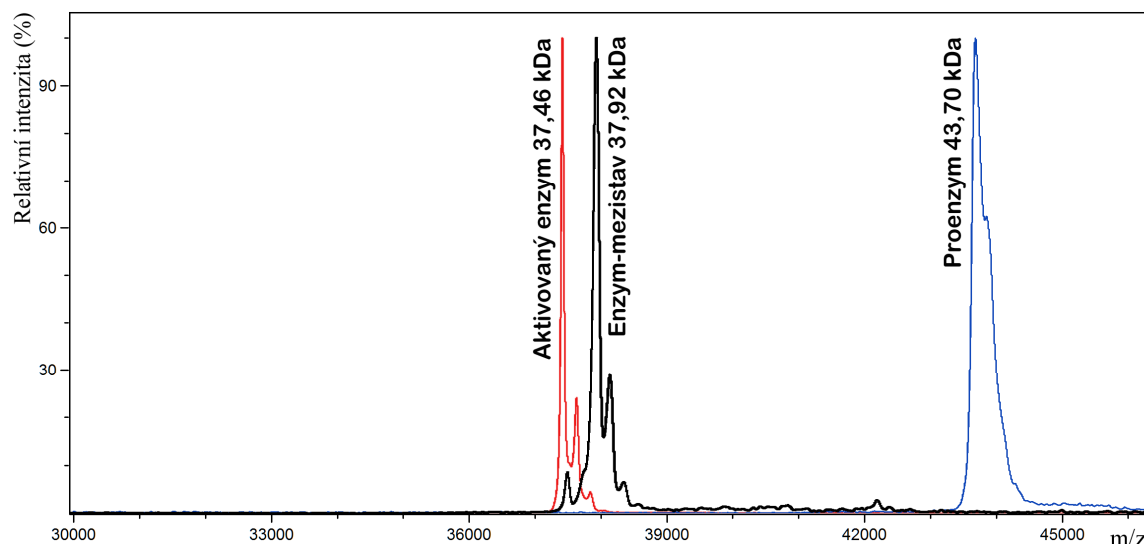
5.3.2 Ověření proteinů po renaturaci pomocí hmotnostní spektrometrie

Po renaturaci byly proteiny ověřeny pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (metoda 4.2.5). Změřené molekulové hmotnosti proenzymů, obrázek 5-4 a 5-5 (strana 50) modrá křivka, (**Nep I** - 43,70 kDa; **Rpn** - 39,58 kDa) odpovídají predikovaným průměrným molekulovým hmotnostem pro **Nep I** (43,73 kDa, aminokyseliny 25-437 pro Q766C3- přístupové číslo do databáze uniprot) a **Rpn** (39,60 kDa, aminokyseliny 18-393 pro Q02017- přístupové číslo do databáze uniprot). To lze považovat za první ověření, že byl připraven požadovaný protein. Druhý důkaz byl získán analýzou okyselených preparátů. U obou vzorků byl pozorován posun k nižším molekulovým hmotnostem odpovídající odštěpení propeptidu. U **Rpn** byla naměřena hodnota 35,93 kDa, což odpovídá teoretické průměrné

hmotnosti aktivovaného enzymu (35,97 kDa, AK 60-393), viz obrázek 5-4. Pro **Nep I** byla získána hodnota 37,92 kDa, která odpovídá sekvenci 75-437 a teoretické průměrné molekulové hmotnosti 37,90 kDa. Tato forma **Nep I** sice není finálním aktivovaným enzymem, nicméně po dalších 24 hodinách inkubace v kyselém prostředí dochází k odštěpení dalších 4 aminokyselin na N-konci a ustavení očekávané aktivní formy enzymu (79-437, 37,46 kDa), viz obrázek 5-5 strana 49. Pozorování odpovídají dříve publikovaným výsledkům z naší skupiny [39]. Schopnost autoaktivace tak kromě ověření molekulové hmotnosti poskytla i důkaz o proteolytické aktivitě připravených enzymů.



Obrázek 5-4: Sledování autoaktivace rhizopuspepsinu okyselením roztoku pomocí MALDI-TOF. Proenzym (modrá křivka) **Rpn** je jednokrokově autokatalyticky štěpen na aktivní formu o molekulové hmotnosti 35,93 kDa (zelená křivka).



Obrázek 5-5: Sledování autoaktivace nepenthesinu okyselením roztoku pomocí MALDI-TOF. Nejprve je proenzym (modrá křivka) autokatalyticky štěpen na formu s molekulovou hmotností 37,92 kDa (černá křivka) a po dalších 24 hodinách dojde k odštěpení dalších 4 aminokyselin od N-konce za vzniku aktivní formy enzymu o hmotnosti 37,46 kDa (červená křivka).

5.4 Závislost aktivity proteas na experimentálních podmínkách

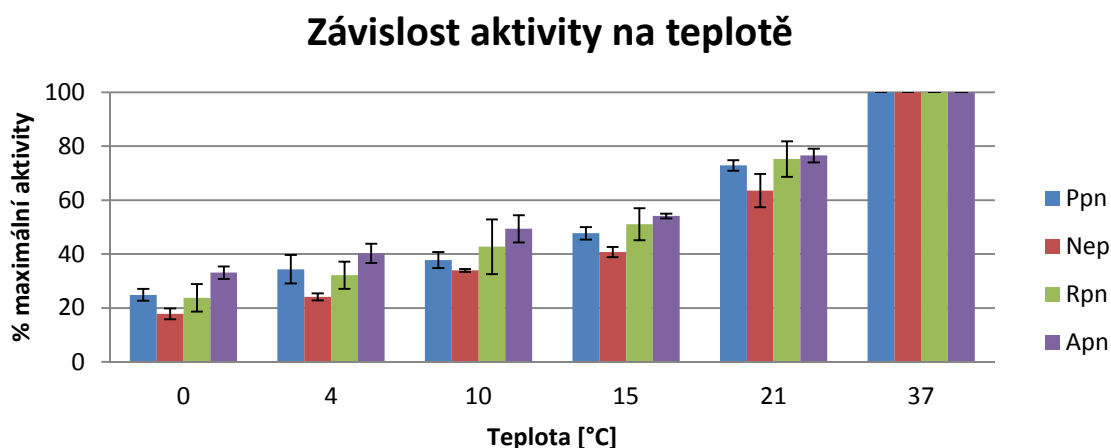
Po ověření proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie byly provedeny aktivní testy s renaturovanými a aktivovanými proteasami nepenthesinem a rhizopuspepsinem. Dále k nim byly připraveny komerčně dostupné proteasy prasečí pepsin A a aspergillopepsin z *Aspergillus saitoi* pro srovnání aktivit v různých podmínkách, které byly zajímavé z pohledu experimentů HX-MS.

5.4.1 Závislost aktivity na teplotě

Byl sledován vliv teploty na aktivitu čtyř sledovaných enzymů. Pepsin A byl připraven rozpuštěním 1 mg lyofilizovaného preparátu do 1 ml destilované vody. Aspergillopepsin byl připraven rozpuštěním komerčního extraktu Z opakovaného měření koncentrace aspergillopepsinu bylo zjištěno, že výrobcem dodávaný hrubý extrakt obsahuje pouze přibližně 10 % proteasy. Proto bylo přibližně odváženo a rozpuštěno 10 mg hrubého extraktu v 1 ml destilované vody a následně musela být po každé přípravě aspergillopepsinu stanovena jeho koncentrace pomocí BCA.

Zvolené teploty byly: 0, 4, 10, 15, 21 a 37°C. Substrátem byl hemoglobin o koncentraci 20 mg/ml. Do reakce se přidávalo 5 µl proteasy o koncentraci 1 mg/ml a reakce byla zastavena pomocí 50 µl TCA.

Na grafu 5-1 je zobrazena závislost aktivity všech studovaných proteas na teplotě, při které reakce probíhala.

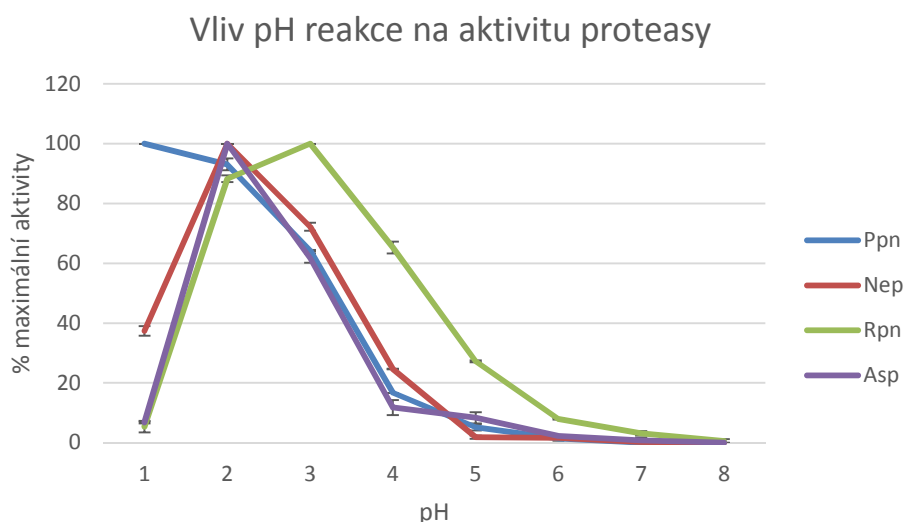


Graf 5-1: Graf závislosti aktivity pepsinu (modře), nepenthesinu (červeně), rhizopuspepsinu (zeleně) a aspergillopepsinu (fialově) na teplotě, při které probíhala reakce. Aktivita proteas je zde vyjádřena jako procento jejich maximální aktivity při 37 °C, která je pro jednotlivé proteasy normalizována na 100 %.

5.4.2 Závislost aktivity na pH reakčního prostředí

Dalším sledovaným parametrem byl vliv pH na aktivitu proteas (kapitola 4.3.3). Experiment byl oproti teplotní závislosti pozměněn tak, že substrátem byl hovězí sérový albumin o koncentraci 20 mg/ml. Reakčním pufrům byly McIlvainovy pufrы o pH 2,2; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0. Pufrы byly připraveny smícháním příslušného množství 0,1M roztoku kyseliny citrónové s 0,2M roztokem Na_2HPO_4 . Pro pH 1,0 byl připraven 100mM glycinový pufr.

Na grafu 5-2 je ukázán vliv pH prostředí na aktivitu proteas. Z grafu je patrné, že pepsin je neaktivnější při pH 1 oproti zbylým proteasám a dále, že celý aktivní profil rhizopuspepsinu je posunut k vyšším hodnotám pH. Vzhledem k tomu, že digesce proteasami v HX-MS experimentech probíhá při pH 2,5 jsou všechny čtyři zkoumané proteasy z tohoto hlediska vhodné.



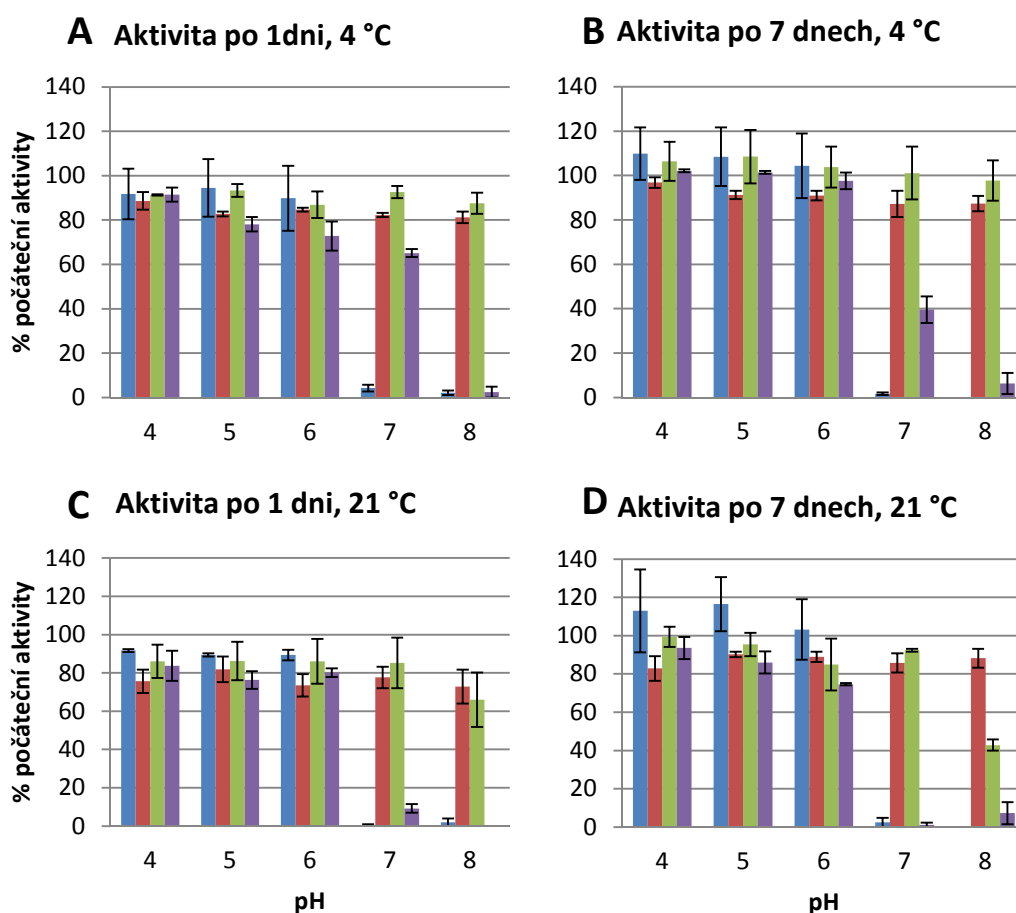
Graf 5-2: Graf závislosti aktivity proteas na pH reakce. Aktivita proteas je vyjádřena jako procento jejich maximální dosažené aktivity v experimentu.

5.4.3 pH stabilita

Dalším sledovaným faktorem byla stabilita proteas v pH 4-8. Sledoval se vliv na aktivitu po jednom a sedmi dnech. Dále se sledovala aktivita při dvou různých teplotách a to 4 °C (uskladnění v lednici), a 21 °C, které odpovídalo laboratorní teplotě. Účelem pokusu bylo zjistit, za jakých hodnot pH a teploty proteasy ztrácí výrazně svoji aktivitu. Výsledky tohoto pokusu jsou zajímavé hlavně pro provedení a optimalizaci imobilizačního protokolu.

Na obrázku 5-6A je aktivita proteas měřená po jednom dni, poté co byly skladovány při 4 °C. Z výsledků je patrné, že vyšší hodnoty pH, tj. 7 a 8, dobře zvládají proteasy nepenthesin a rhizopuspepsin. Zatím co pepsin ztrácí aktivitu úplně při pH > 6, aspergillopepsin při pH 7 vykazuje 60-70% aktivitu.

Na obrázku 5-6B je znázorněna aktivita proteas po sedmi dnech inkubace a skladování při 4 °C. Stabilita v tomto případě plně kopíruje výsledky po jednom dni s tím, že aktivita **Apn** klesla na 40 % počáteční aktivity.



Obrázek 5-6: pH stabilita proteas po jednom a sedmi dnech při 4 a 21°C. Zobrazení aktivity proteas pepsinu (modrá) nepenthesinu (červená) rhizopuspepsinu (zelená) a aspergillopepsinu (fialová) po jednom (A, C) a sedmi (B, D) dnech při 4 (A, B) a 21 (C, D) °C. Aktivita je vyjádřena jako % počáteční aktivity

Pro srovnání byl proveden stejný experiment, ale inkubace byla provedena při teplotě 21 °C. Po prvním dnu, obrázek 5-6C, klesla výrazně aktivita **Apn** při pH 7 až na hodnotu 10 % počáteční aktivity. Taktéž rekombinantní připravený **Nep** a **Rpn** ztrácely výrazněji

aktivitu při pH 8. Po sedmi dnech, obrázek 5-6D strana 53, vykazovaly proteasy při pH 4-6 pokles aktivity na 80 %, vyjma pepsinu. Zatímco **Rpn** uchovávaný při 4°C dosahoval téměř 100 % aktivity, při teplotě 21 °C se dostával již mírně přes 60 %. Podobný trend pak byl sledován i u nepenthesinu.

5.4.4 Vliv denaturačních a redukujících činidel

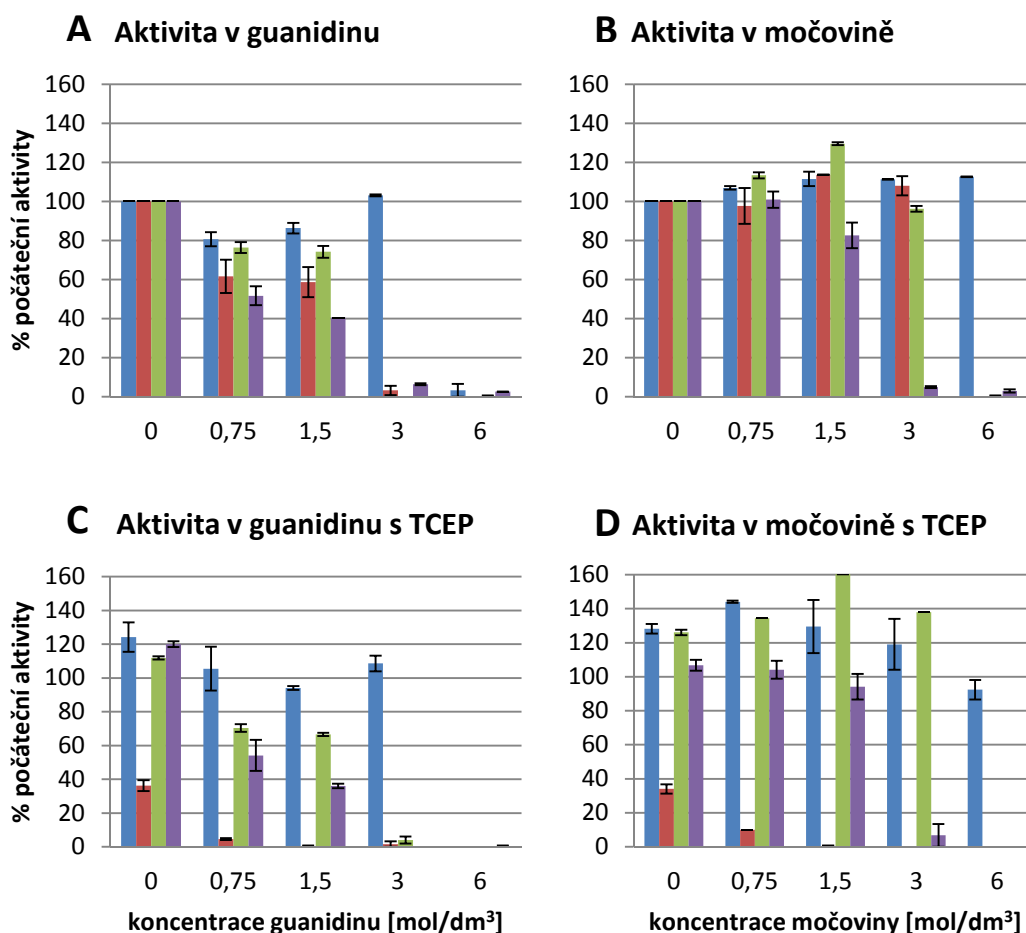
Byl sledován vliv denaturačních a redukčních činidel na aktivitu proteas. Redukčním činidlem byl tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) o koncentraci 0,1M a denaturačními činidly byly guanidin a močovina. Experimenty byly provedeny ve dvou sadách vždy s 0,1M TCEP a bez redukčního činidla. Koncentrace denaturačních činidel byly 0, 0,75, 1,5, 3 a 6M. Roztok o 6M koncentraci denaturačního činidla fungovala jako kontrola, kdy proteasy ztratily veškerou aktivitu. Z hlediska HX-MS experimentů je to zajímavé proto, že před vlastním štěpením proteasou může být vzorek značeného proteinu inkubován s denaturačními a redukčními činidly, které by měly pomáhat štěpení proteinů s kompaktní strukturou či s disulfidickými můstky.

Na obrázku 5-7A strana 55, je zobrazena závislost aktivity proteasy na koncentraci denaturačního činidla guanidinu. Zajímavý je vliv koncentrace guanidinu na aktivitu pepsinu, kdy nejprve dojde ke snížení aktivity a pak postupně aktivita vystoupá zpátky na původní úroveň. Zajímavá je i koncentrace 3M guanidinu, kde kromě pepsinu již nevykazují téměř žádnou aktivitu zbylé proteasy. Při koncentraci 6M guanidinu, je aktivita všech proteas téměř nulová.

Na obrázku 5-7C, strana 55, je zobrazena stejná závislost aktivity proteasy na koncentraci denaturačního činidla guanidinu navíc s obsahem 0,1M TCEP, jako redukčního činidla. U pepsinu, **Rpn** a **Apn** lze pozorovat stejnou závislost jako na panelu 5-2A. U **Nep** aktivita klesá téměř na nulu, pokud je přidán 0,75M guanidin a při vyšších koncentracích aktivita úplně mizí. Mimo **Nep** TCEP zvýšil aktivitu všech proteas.

Na obrázku 5-7B strana 55, je závislost aktivity proteas na koncentraci močoviny, jako denaturačního činidla. **Ppn**, **Nep** a **Rpn** vykazují se zvyšující se koncentrací močoviny nárůst aktivity až do koncentrace 3M močoviny. Poté jejich aktivita vyjma pepsinu, který se drží nad 100 % maximální aktivity, padá na nulu. Citlivější **Apn** začíná ztrácet aktivitu v 1,5M koncentraci močoviny a v 6M močovíně se aktivita blíží nule.

Na obrázku 5-7D je ukázána závislost aktivity proteas na koncentraci močoviny, která obsahovala navíc 0,1M TCEP. U pepsinu aktivita nejprve naroste v 0,75M močovinně a pak postupně klesá. Přesto v 6M močovinně má aktivitu kolem 90 %. **Nep** v TCEP ztratí hned 70% své původní aktivity a při přidání 0,75M močoviny se dostává na 10 % své původní aktivity. Aktivita **Rpn** nejprve stoupá a dosahuje svého maxima v 1,5M močovinně a pak opět klesá, přičemž v 6M močovinně aktivitu zcela ztrácí. **Apn** pomalu ztrácí aktivitu až do 1,5M močoviny a při vyšších koncentracích je téměř neaktivní. Mimo **Nep** TCEP zvýšil aktivitu všech proteas.



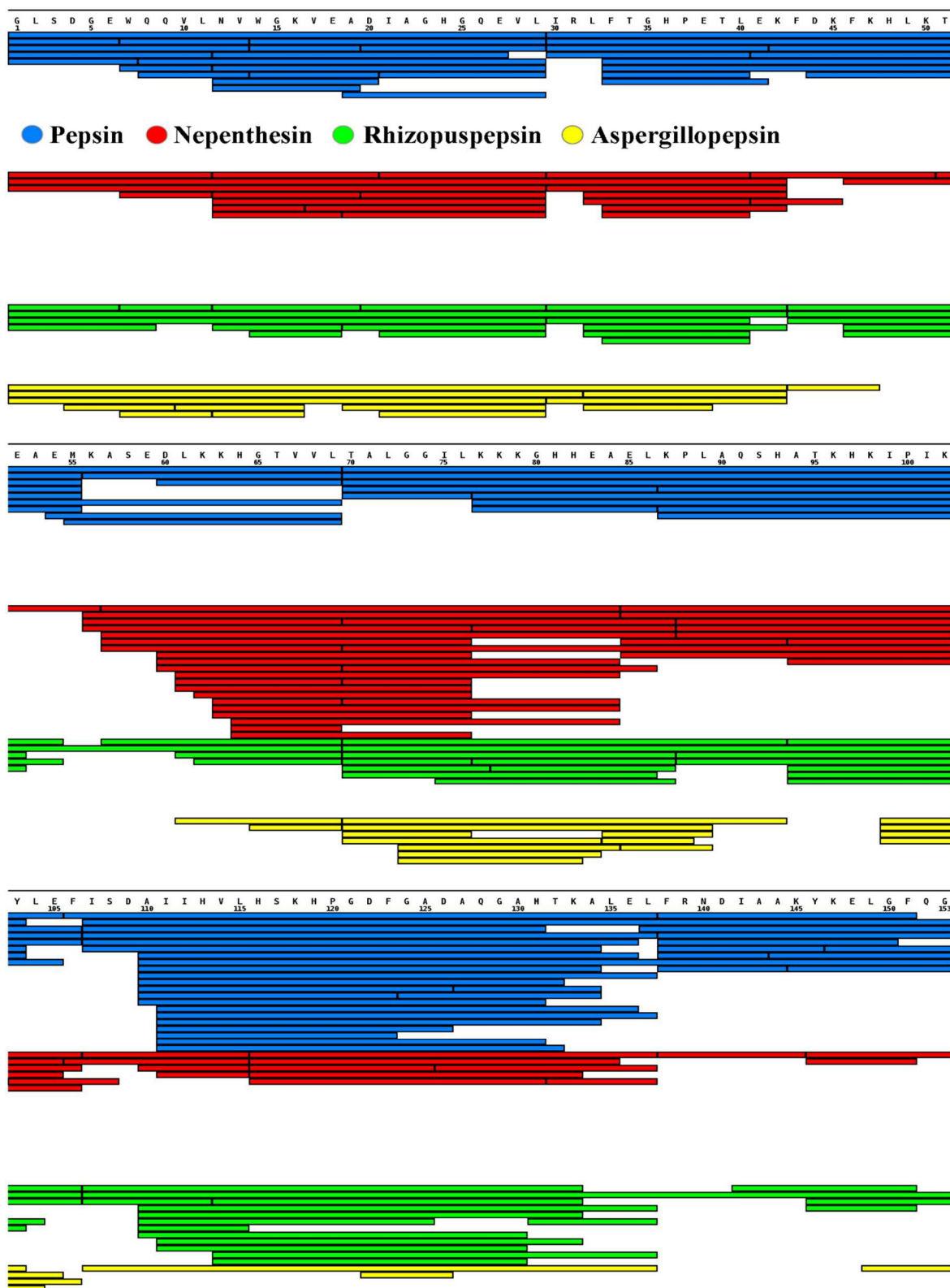
Obrázek 5-7: Vliv denaturačních činidel guanidinu (A, C) a močoviny (B, D) při různých koncentracích a vliv redukčního činidla 0,1M TCEP (C, D) na aktivitu pepsinu (modrá), nepenthesinu (červená), rhizopuspepsinu (zelená) a aspergillopepsinu (fialová). Aktivita nepenthesinu rapidně klesla, pokud bylo v roztoku redukční činidlo TCEP.

5.5 Imobilizace proteas

Po úspěšné renaturaci nepenthesinu a rhizopuspepsinu *in vitro* byla provedena jejich imobilizace na polymerní nosič POROS podle optimalizovaného protokolu vycházejícího z dříve publikovaného postupu a z výsledků diplomové práce metodou 4.4.1 a 4.4.2. K těmto proteasám byly navíc připraveny komerčně dostupné proteasy pepsin a aspergillopepsin.

Imobilizovanou proteasou byly poté naplněny kolony, viz metoda 4.4.3, které byly následně promývány 0,4% kyselinou mravenčí po dobu jedné hodiny. Tak byly kolony s proteasou připraveny pro online digesci. Pro test digesce proteas byl vybrán myoglobin. LC MS/MS analýza byla provedena metodou 4.4.4 a peptidy byly identifikovány v programu MASCOT (MatrixScience). Výsledky byly zpracovány a vizualizace sekvenčního pokrytí bylo provedeno pomocí nástroje Draw Map dostupného na webových stránkách MS Tools [40], viz obrázek 5-6 strana 57.

Na obrázku 5-6 strana 57, je znázorněna peptidová mapa znázorňující pokrytí myoglobinu po online digesci na koloně s imobilizovanou proteasou. Na hoře je uvedena aminokyselinová sekvence a pod ní jsou barevně vyznačeny vzniklé peptidyze kterých lze odvodit zásahová místa jednotlivých proteas, která jsou v mapě znázorněna jako přerušení daných pruhů. Pro **Ppn**, **Nep I** a **Rpn** je pokrytí sekvence 100% u **Apn** pouze 81%. Pro posouzení účinnosti štěpení byl také sledován počet peptidů a jejich průměrná délka pro jednotlivé proteasy. Výsledky byly následující: **Ppn** 78/18,0, **Nep I** 73/14,1, **Rpn** 56/14,6 a **Apn** 32/11,8, kde uvedené hodnoty jsou *počet peptidů/průměrná délka peptidu*. V peptidové mapě se vyskytují i prázdná místa, kdy vzniklé peptidy nebyly zachyceny pomocí MS. Při pohledu například na lysiny K42 a K45, lze vidět, že pepsin za těmito aminokyselinami neštěpí, zatímco zbylé tři proteasy zde štěpí a navíc v této oblasti vytvářejí překrývající se peptidy. Další zajímavou oblast najdeme mezi aminokyselinami H55-L69. Zde je vidět jak pepsin štěpí za H55, ale za H64 již ne, dále je patrné větší množství peptidů tvořených nepenthesinem, který štěpí za H55, K56, E59, D60, L61. K62 a K63. Právě takovéto překrývající se peptidy zvyšují prostorové rozlišení a zvyšují přesnost lokalizace vázaného deuteria v aminokyselinové sekvenci. Další zajímavou oblastí je například zásahové místo za L115. I když je leucin aminokyselinou, za kterou pepsin obvykle štěpí, v této oblasti na rozdíl od nepenthesinu neštěpil ani jednou. Obdobné zásahové místo je za K98, kde kupříkladu štěpil pouze aspergillopepsin.



Obrázek 5-6: Peptidová mapa znázorňující pokrytí myoglobinu po online digesti na kolonách s různými imobilizovanými proteasami. Barevné pruhy pod aminokyselinovou sekvencí myoglobinu představují jednotlivé peptidy identifikované pomocí LC-MS/MS analýz.

4 Diskuze

Studium struktury a strukturních změn proteinů pomocí techniky HX-MS je stále používanější metodou ve strukturní biologii. Díky pokrokům v technologii je možné HX-MS využívat ke studiu stále složitějších proteinových komplexů. Hlavním cílem této práce byla příprava rekombinantních proteas nepenthesinu I (*Nepenthes gracilis*), a rhizopuspepsinu (*Rhizopus chinensis*), a jejich srovnání s komerčně dostupnými proteasami prasečím pepsinem A a aspergillopepsinem (*Aspergillus saitoi*). Srovnání bylo provedeno jak na úrovni aktivity (závislost aktivity proteas na experimentálních podmínkách) se substrátem hemoglobinem, tak na úrovni testování proteas v HX-MS kompatibilních podmínkách s modelovým proteinem myoglobinem.

Nejprve byly vyprodukovány rekombinantní proteasy nepenthesin I a rhizopuspepsin, které již byly dříve v naší laboratoři úspěšně připraveny [28, 39]. Jedním z experimentů byla snaha o produkci rhizopuspepsinu v produkčních buňkách C41 (*E. coli*). Věděli jsme, že buňky C41 produkují velmi dobře a ve vysokém výtěžku nepenthesin, a tak jsme je chtěli využít pro produkci rhizopuspepsinu. Pro rhizopuspepsin byla popsána produkce v buňkách Gold (*E. coli*), ale výtěžky této produkce byly obecně menší než jaké poskytovaly buňky C41 v případě nepenthesinu. Bohužel buňky C41 **Rpn** vůbec neprodukovaly. Proto byl rhizopuspepsin produkován v buňkách Gold.

Produkce nepenthesinu proběhla dle zavedeného protokolu dosahujícího výtěžků v desítkách miligramů aktivní proteasy na litr produkční kultury [39]. Dalším krokem byla renaturace proteas *in vitro*. Též byla zkoušena optimalizace, jejíž cílem bylo snížit množství spotřebovaných chemikálií. Dle klasického protokolu se na 1 mg inkluzních tělísek použil 1 ml renaturačního pufru. V tomto provedení je potřeba velkého objemu renaturačního pufru (desítky litrů). Proto byl vyzkoušen optimalizovaný protokol, kdy na 10 mg inkluzních tělísek, byl použit 1 ml renaturačního pufru. Výsledky jasně ukázaly, že tento krok je naprosto nevhodný pro renaturaci nepenthesinu, protože bylo získáno o 70 % méně proteinu. U rhizopuspepsinu byla ztráta po renaturaci podstatně menší, okolo 20 %, a zde by se dalo uvažovat o úpravě podmínek a vyzkoušení jiného poměru množství inkluzí ku renaturačnímu pufru, ale to již nebylo předmětem této práce.

Renaturované proteasy byly podrobeny aktivitním testům, kdy byly zkoušeny různé podmínky, které byly zajímavé z hlediska vodík/deuteriové výměny a protokolu pro

imobilizaci proteas. Souběžně s rekombinantními proteasami byly pro srovnání testovány i komerčně dostupný pepsin a aspergillopepsin. Prvním sledovaným parametrem byl vliv teploty na aktivitu proteas. Ze zvoleného rozsahu teplot byla dle očekávání nejvyšší aktivita všech proteas při teplotě 37 °C. Z pohledu experimentálních podmínek HX-MS však bylo zajímavé srovnání aktivity proteas při nižších teplotách. Z vlivu teploty na vodík/deuteriovou výměnu je známo, že při přechodu o 10 °C se změní rychlost výměny trojnásobně. Při přechodu k nižším teplotám se tak prodlouží poločas, po který zůstává deuterium navázáno na amidu v peptidové vazbě. Z pohledu podmínek HX-MS experimentu je tedy optimální aby digesce probíhala při 0 °C. Na druhou stranu, pro řadu proteinů s kompaktní strukturou přináší zvýšení teploty zásadní zlepšení efektivity digesce. Pozorované rozdíly v aktivitě jednotlivých proteas, které mezi 0 a 21 °C byly okolo 40 %, poskytují vysvětlení pro tento jev. Tyto rozdíly v aktivitě jsou poměrně velké a jsou zajímavé pro vodík/deuteriovou výměnu v provedení, kdy celá analýza probíhá při teplotě 0 °C, mimo digesce, kdy kolona s imobilizovanou proteasou je ohřívána na vyšší teplotu. V případě využití kolon s imobilizovanou proteasou je čas digesce v rozsahu vteřin až desítek vteřin a zpětná výměna tak navzdory vyšší teplotě zůstává minimální.

Dalším sledovaným parametrem byl vliv pH reakce na aktivitu proteas. Výsledkem bylo zjištění, že při pH 2,5, které je pro experimenty vodík/deuteriové výměny zásadní, a kdy je zpětná výměna deuterií za vodíky z roztoku nejmenší, jsou všechny zkoušené proteasy aktivní z minimálně 80 %, dále že použitý pepsin je neaktivnější při pH 1,0 a že rhizopuspepsin je více aktivní za vyšších hodnot pH, než ostatní studované proteasy.

V rámci aktivitních esejí byl proveden experiment, kdy se sledovala pH stabilita proteas za různých hodnot pH po dobu 1 a 7 dnů při teplotách 4 a 21 °C. Tento experiment byl proveden s ohledem na dostupný imobilizační protokol, kdy jsou proteasy při imobilizaci přes noc uchovávány při laboratorní teplotě a při určitém pH. Pro efektivitu imobilizace aspartátových proteas je potřeba nalézt vhodný kompromis mezi pH nepůsobícím ireverzibilní inhibici proteas a pH optimální z pohledu chemického mechanismu imobilizační reakce. Imobilizační reakce nepenthesinu a rhizopuspepsinu se dle klasického protokolu ukončuje použitím pufru o pH 7,3. Z výsledků aktivitních testů bylo známo, že **Nep** i **Rpn** za těchto podmínek vykazují minimální pokles aktivity, zatímco **Ppn** a **Apn** jsou i po krátké inkubaci při tomto pH téměř zcela inaktivovány. Na základě těchto znalostí bylo

možné navrhnout optimalizovaný protokol i pro **Ppn** a **Apn**, kdy nebylo během imobilizace překročeno pH nad hodnotu 6.

Dalším z experimentů bylo sledování vlivu denaturačních a redukčních činidel na aktivitu proteas. Jako denaturační činidla byla zvolena močovina a guanidin a redukčním činidlem byl TCEP. Tato činidla se používají HX-MS experimentech pro vylepšení digesce proteinů s kompaktní strukturou a/nebo disulfidickými můstky. Nejvíce se přidavku těchto činidel využívá v průtokovém (online) uspořádání, kdy je minimalizován denaturující/redukční vliv na samotnou proteasu. Jelikož byla popsána citlivost nepenthesinu vůči denaturaci a redukci [25, 44], byl zkoumán vliv činidel také na ostatní proteasy.

Výsledky těchto experimentů potvrdily senzitivitu nepenthesinu k denaturačním a redukčním činidlům. Obecně lze říci, že TCEP měl pozitivní vliv na digesti proteinů všech proteas vyjma nepenthesinu. Při porovnání aminokyselinových sekvencí všech 4 proteas je vidět, že molekula nepenthesinu obsahuje 12 cysteinových zbytků, které tvoří disulfidové můstky a proto je nepenthesin k tomuto činidlu, na rozdíl od zbývajících proteas, které vykazovaly v tomto prostředí zvýšenou aktivitu, tak citlivý.

Dalším zajímavým jevem je například v guanidinu nejprve snížení aktivity pepsinu a následně se zvyšující se koncentrací guanidinu postupný návrat na původní úroveň. Možným vysvětlením je, že guanidin při těchto koncentracích vysoloval z roztoku substrát a následně při vyšších koncentracích, došlo k vysolení. Stejný trend vykazovaly i ostatní proteasy, ale již se nedostávaly na původní aktivitu.

V močovině byl trend v aktivitě zcela opačný, kdy nejprve došlo ke zvýšení aktivity všech proteas a pak k jejich snížení. I když mechanismus vlivu obou činidel není zcela přesně znám, ví se, že pracují jiným způsobem. Proto je dobré při HX-MS experimentech kombinovat obě činidla pro zvýšení účinnosti digesce proteinů s kompaktní strukturou [67].

Při imobilizaci proteas se využíval klasický protokol, který je popsán v metodické části této práce. Při imobilizaci nepenthesinu a rhizouspepsinu jsme nenarazili na žádný problém. Při imobilizaci pepsinu a aspergillopepsinu, jak už bylo zmíněno výše, klasický protokol nemohl být použit. Na základě těchto zjištění a výsledků stabilit byl v zastavovacím pufru vyměněn Tris-HCl za acetát a pH pufru bylo sníženo na 5,5. Po této úpravě zastavovacího pufru proběhla imobilizace bez ztráty aktivity způsobené pH-závislou inaktivací proteasy.

Finálním experimentem bylo testování imobilizovaných proteas na modelovém proteinu myoglobinu. Tímto pokusem se mimo sekvenčního pokrytí proteinu, srovnání štěpných preferencí jednotlivých enzymů sledoval i vliv imobilizace na aktivitu proteas.

Z hlediska sekvenčního pokrytí dosahoval pepsin, nepethesin a rhizopuspepsin 100% sekvenčního pokrytí, zatím co aspergillopepsin dosahoval pouze 82% sekvenčního pokrytí. To mohlo být způsobeno buď snížením aktivity v důsledku imobilizace a/nebo štěpením daných oblastí na krátké peptidy, které nebyly detekovány.

Jak bylo zmíněno dříve, při imobilizaci dochází k navázání proteasy na nosič přes primární amin (lysin a N-konec proteinu). Ze srovnání sekvence všech 4 proteas (příloha P1-P4) vidíme, že nepenthesin a pepsin mají ve své molekule pouze jednu aminokyselinu lysin. Společně s aminoskupinou na N-konci proteinu tak poskytují pouze dvě reaktivní skupiny pro imobilizaci. Při bližším pohledu na známou strukturu prasečího pepsinu (databáze PDB přístupový kód 4PEP) a homologní model nepenthesinu je patrné, že tyto aminy jsou lokalizovány v úzce ohraničené oblasti na opačné straně od aktivního místa v oblasti mezi oběma subdoménami. Proto lze očekávat imobilizaci **Ppn** a **Nep I** pouze ve velmi omezeném počtu orientací a bez zásadního vlivu na přístupnost aktivního centra či dynamiku celého proteinu. Oproti tomu rhizopuspepsin a aspergillopepsin mají shodně 13 lysinových zbytků z části odlišně lokalizovaných na svém povrchu. Proto lze očekávat jak řadu různých způsobů navázání na nosič, tak i rozdílných orientací obou proteas. To může být vysvětlením pozorovaných rozdílů mezi oběma proteasami v efektivitě štěpení modelového proteinu myoglobinu.

5 Souhrn

- Byly vyprodukovány a renaturovány proteasy nepenthesin a rhizopuspepsin .
- Byly provedeny aktivní testy, které ukázaly chování proteas pepsinu, rhizopuspepsinu, aspergillopepsinu a nepenthesinu, při různých podmínkách zajímavých pro experimenty vodík/deuteriové výměny (vliv pH, teploty a vliv denaturačních a redukčních činidel).
- Všechny čtyři proteasy byly úspěšně imobilizovány na porézní nosič POROS a byly otestovány v LC MS/MS experimentech za HX-MS experimentálních podmínek.

Citace

- [1] Alberts, B.: *Cell*, **92**, 291-294 (1998)
- [2] Marcsisin, S. R., Engen, J. R.: *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**, 967-72 (2010)
- [3] Engen, J. R.: *Anal. Chem.*, **81**, 7870-7875. (2009).
- [4] Iacob, R. E., Engen, J. R.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **23**, 1003-10 (2012)
- [5] Deschamps, R. J.: *Life Sci.*, **86**, 585-589 (2010)
- [6] Li, C., Liu, M.: *FEBS Lett.*, **587**, 1008-1011 (2013)
- [7] Schellman, A. J., Schellman, G. C.: *Protein Sci.*, **6**, 1092-1100 (1997)
- [8] Linderstrøm-Lang, K. U., Schellman, J. A.: In: Boyer PD, Lardy H, Myrback K, editors. *The enzymes*. New York: Academic Press;. pp. 443-510 (1959)
- [9] Hallaway, E. B., Benson, E. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **107**(1), 154-157 (1965)
- [10] Hvidth, A., Johansen, G., Linderstrøm-Lang, K., Vaslow, F.: *C R Trav Lab Carlsberg Chim.*, **29**(9):129-57 (1954)
- [11] Englander, S. W.: *Protein Sci.*, **6**, 1101-1109 (1997)
- [12] Katta, V., Chait, B. T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **5**, 214-217 (1991)
- [13] Zhang, Z., Smith, D. L.: *Protein Sci.* **2** (4), 522-31 (1993)
- [14] Roulhac, P. L., Powell, K. D., Dhungana, S., Weaver, K. D., Mietzner, T. A., Crumbliss, A. L., Fitzgerald, M. C.: *Biochemistry*, **43**(50), 15767-74 (2004)
- [15] Cravello, L., Lascoux, D., Forest, E.: *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **17**, 2387-2393 (2003)
- [16] Wang, L., Pan, H., Smith, L. D.: *Mol. Cell. Proteomics*, **1**, 132-138 (2002)
- [17] Englander, S. W., Kallenbach, N. R.: *Q Rev Biophys* **16**, 521-655 (1983)
- [18] Webová stránka HXMS.com [citace 10.4.2014] <http://www.hxms.com>
- [19] Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L., Englander, S. W.: *Proteins*, **17**, 75-86 (1993)

- [20] Brock, A.: *Protein. Expr. Purif.*, **84**, 19-37 (2012)
- [21] Wales, T. E., Engen, J. R.: *Mass Spectrom. Rev.*, **25**, 158-70 (2006)
- [22] Engen, J. R., Wales, T. E., Shi, X.: *Encyclopedia of analytical chemistry.*, 2-17 (2011)
- [23] Ahn, J., Cao, M.-J., Yu, Y. Q., Engen, J. R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**, 1222-1229 (2012)
- [24] Rey, M., Yang, M., Burns, K. M., Yu, Y., Lees-Miller, S. P., Schriemer, D. C.: *Mol. Cell. Proteomics*, **12**, 464-72 (2013)
- [25] Kadek, A., Mrazek, H., Halada, P., Rey, M., Schriemer, D. C., Man, P.: *Anal. Chem.*, **8**, (2014)
- [26] Ahn, J.: Local hydrogen deuterium exchange mass spectrometry: from pressurized online digestion to pepsin proteolysis: Disertační práce Northeastern University, Department of chemistry and chemical biology, str. 49-52 (2013)
- [27] Wang, L., Smith, D. L.: *Curr Protoc Protein Sci.*, Chapter 17 (2002)
- [28] Rey, M., Man, P., Brandoli, G., Forest, E., Pelosi, L.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 3431-3438 (2009)
- [29] Jørgensen, T. J., Gårdsvoll, H., Ploug, M., Roepstorff, P.: *J. Am. Chem. Soc.* **127** (8), 2785-93 (2005)
- [30] Jørgensen, T. J., Bache, N., Roepstorff, P., Gårdsvoll, H., Ploug, M.: *Mol. Cell Proteomics* **4** (12): 1910-9 (2005)
- [31] Rand, K. D., Adams, C. M., Zubarev, R. A., Jørgensen, T. J.: *J. Am. Chem. Soc.* **130** (4): 1341-9 (2008)
- [32] Zehl, M., Rand, K. D., Jensen, O. N., Jørgensen, T. J.: *J. Am. Chem. Soc.* **130** (51): 17453-9 (2008)
- [33] Davies, D. R.: *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **19**, 189-215 (1990)
- [34] Dunn, B. M.: *Chem. Rev.*, **102**, 4431-4458 (2002)

- [35] Simoes, I., Faro, C.: *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2067-2075 (2004)
- [36] Runeberg-Roos, P., Törmäkangas, K., Ostman, V.: *Eur. J. Biochem.*, **202**, 1021-1027 (1991)
- [37] Ichishima E.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 675-688 (2000)
- [38] Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Bateman, A.: *Nucleic Acids Res.*, **40**, D343-50 (2012)
- [39] Kadek, A., Tretyachenko, V., Mrazek, H., Ivanova, L., Halada, P., Rey, M., Man, P.: *Protein Express Purif.*, **95**, 121-128 (2014)
- [40] Darebná, P.: Využití kyselých proteáz z láčkovek pro účely vodík/deuteriové výměny: Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 9-14 (2013)
- [41] Weng, W.-Y., Wu, T., Chen, W.-Q., Liu, G.-M., Osatomi, K., Su, W.-J., Cao, M.-J.: *Fish Physiol. Biochem.*, **37**, 543-552 (2011)
- [42] De Luca, V., Giovanna, M., Mauro, G.: *Mar. Genomics*, **2**, 1-10 (2009)
- [43] Foltmann B.: *Essays Biochem.*, **17**, 52-84 (1981)
- [44] Kubota, K., Metoki, Y., Athauda, S. B. P., Shibata, C., Takahashi, K.: *Biosci., Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2323-2326 (2010)
- [45] Athauda, S. B. P., Matsumoto, K., Rajapakshe, S., Kuribayashi, M., Kojima, M., Kubomura-Yoshida, N., Takahashi, K.: *Biochem. J.*, **381**, 295-306 (2004)
- [46] Rey, M., Man, P., Brandoli, G., Forest, E., Pelosi, L.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 3431-3438 (2009)
- [47] Takahashi, K., Niwa, H., Yokota, N., Kubota, K., Inoue, H.: *Plant Physiol. Biochem., PPB*, **46**, 724-9 (2008)
- [48] Amagase, S.: *J. Biochem.*, **72**, 73-81 (1972)
- [49] Giusto, B., Grosbois, V., Fargeas, E., Marshall, D. J., Gaume, L. J.: *Biosciences*, **33**, 121-136 (2008)

- [50] Ulrike Bauer, W. F.: *Plant Signal. Behav.*, **11**, 1019-1023 (2009)
- [51] Mithöfer, A.: *Phytochemistry*, **72**: 1678-1682. (2011)
- [52] Chia, T. F., Aung, H. H., Osipov, A. N., Goh, N. K., Chia, L. S.: *Redox Rep. : Communications in Free Radical Research*, **9**, 255-61 (2004)
- [53] S.B.P. Athauda, K. Matsumoto, S. Rajapakshe, M. Kuribayashi, M. Kojima, N. Kubomura-Yoshida,: *Biochem. J.*, **381**, 295-306 (2004)
- [54] K. Takahashi, S.B.P. Athauda, K. Matsumoto, S. Rajapakshe, M. Kuribayashi, M. Kojima, et al.: *Curr. Protein Pept. Sci.* **6**, 513–525 (2005)
- [55] Chen, C.-C., Cho, Y.-C., Lai, C.-C., Hsu, W.-H.: *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 6742-6747 (2009)
- [56] Chens, Z., Koelsch, G., Han, H., Wang, J.-X., Lin, X., Hartsuck, J. A., Tang, J.: *J. Biol. Chem.*, **266**, 11718-11725 (1991)
- [57] Takahashi, K.: *J. Biol. Chem.*, **262**, 1468-1478 (1987)
- [58] Lowther, T. W., Majer, P., Dunn, B. M.: *Protein Sci.*, **4**, 689-702 (1995)
- [59] Shintani, T., Ichishima, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1204**, 257-64. (1994)
- [60] Bhaumik, P., Horimoto, Y., Xiao, H., Miura, T., Hidaka, K., Kiso, Y., Gustchina, A.: *J. Struct. Biol.*, **175**, 73-84 (2011)
- [61] Xiao, H., Tanaka, T., Ogawa, M., Yada, R. Y.: *Protein Eng. Des. Sel.*, **20**, 625-33 (2007)
- [62] Dame, J. B., Yowell, C. A, Omara-Opyene, L., Carlton, J. M., Cooper, R. A, Li, T.: *Mol. Biochem. Parasitol.*, **130**, 1-12 (2003)
- [63] Marcoux, J., Thierry, E., Vivés, C., Signor, L., Fieschi, F., Forest, E.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2009)
- [64] Strohalm, M., Kavan, D., Novák, P., Volný, M., Havlíček, V.: *Anal. Chem.*, **82** (11), 4648-4651 (2010)
- [65] Kavan, D., Man, P.: *Int. J. Mass Spectrom.*, **302**, 53-58 (2011)

- [66] Webová stránka HXMS.com [citace 5.2.2014] <http://www.uniprot.org>
- [67] Lim W. K., Rosgen, J., Englander S. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 2595-600 (2009)

Přílohy

P1 Aminokyselinová sekvence Nepenthesinu I (*N. gracilis*), přístupový kód databáze uniprot - Q766C3

Černou barvou a podtržením je zvýrazněna sekvence odpovídající aktivované protease. Červeně je vyznačen propeptid a šedivou barvou je znázorněna signální sekvence. Tmavě zeleným pozadím je označena aminokyselina lysin (K) v sekvenci, která je důležitá pro imobilizaci na nosič. Na pozicích 113 a 315 jsou žlutým pozadím vyznačeny kyseliny asparagové v aktivním místě. Světle zeleným pozadím jsou zvýrazněny cysteiny tvořící disulfidovou vazbu: 123 – 126, 129 – 203, 150 – 168, 155 – 163, 240 – 434 a 354 – 395. Světlé modrým pozadím jsou naznačena glykosylační místa 53, 98, 131, 198, 267, 307 a 345.

10	20	30	40	50	60					
MASSLYSFLL	ALSIVYIFVA	PTHS	TSRTAL	NHRHEAKVTG	FQIMLEHVDS	GKNLTKFQLL				
70	80	90	100	110	120					
ERAIERGSRR	LQRLEAML	NG	PSGVETSVYA	GDGEYLM	NLS	IGTPAQPFSA	IMDTGSDLIW			
130	140	150	160	170	180					
TOCQPC	CTQCF	NQSTPIFN	PQ	GSSSFSTLP	C	SSQL	CQALSS	PTCSNNF	CQY	TYGYGDGSET
190	200	210	220	230	240					
QGSMGTETLT	FGSVSIP	NIT	FG	CGENNQGF	GQGNGAGLVG	MGRGPLSLPS	QLDVT	KFSYC		
250	260	270	280	290	300					
MTPIGSSTPS	NLLGLSLANS	VTAGSP	N	TTL	IQSSQIPTFY	YITLNGLSVG	STRLPIDPSA			
310	320	330	340	350	360					
FALNSN	NGTG	GIID	SGTTL	TYFVN	NAYQS	VRQEFISQIN	LPVVN	GSSSG	FDL	CFQTPSD
370	380	390	400	410	420					
PSNLQIPTFV	MHFDGGDLEL	PSENYFISPS	NGLI	C	LAMGS	SSQGMSIFGN	IQQQNMLVVY			
430										
DTGNSVVSFA	SAQ	C	GAS							

P2 Aminokyselinová sekvence Rhizopuspepsinu z *Rhizopus chinensis*, přístupový kód databáze uniprot - Q02017

Černou barvou a podtržením je zvýrazněna sekvence odpovídající aktivované protease. Červeně je vyznačen propeptid a šedivou barvou je znázorněna signální sekvence. Tmavě zeleným pozadím je označena aminokyselina lysin (K) v sekvenci, která je důležitá pro imobilizaci na nosič. Na pozicích 103 a 286 jsou žlutým pozadím vyznačeny kyseliny asparagové v aktivním místě. Světle zeleným pozadím jsou zvýrazněny cysteiny tvořící disulfidovou vazbu: 116 – 119, 320 – 353.

10	20	30	40	50	60
TFTLNSSCIA IAALAVDAVN AAPGEKKISI PLAKNPYKPSAKNAIQKAI AKYNKHKINT					
70	80	90	100	110	120
STGGIVPDAG VGTVPMTDYG NDIEYYGQVT IGTPGKKFNL DFDTGSSDLW IASTLCTNCG					
130	140	150	160	170	180
SRQTKYDPKQ SSTYQADGRT WSISYGDGSS ASGILAKDNV NLGGLLIKQ TIELAKREAA					
190	200	210	220	230	240
SFANGPNDGL LGLGFDTITT VRGVKTPMDN LISQGLISRP IFGVYLKAS NGGGGEYIFG					
250	260	270	280	290	300
GYDSTKFGS LTTVPIDNSR GWWGITVDRA TVGTSTVASS FDGILDGTGT LLILPNNVAA					
310	320	330	340	350	360
SVARAYGASD NGDGTYTISC DTSRFKPLVF SINGASFQVS PDSLVEEYQ GQCIAGFGYG					
370	380	390			
NFDFAIIGDT FLKNNYVVFN QGVPEVQIAP VAQ					

P3 Aminokyselinová sekvence prasečího pepsinu A, přístupový kód databáze uniprot - P00791

Černou barvou a podtržením je zvýrazněna sekvence odpovídající aktivované protease. Červeně je vyznačen propeptid a šedivou barvou je znázorněna signální sekvence. Tmavě zeleným pozadím je označena aminokyselina lysin (K) v sekvenci, která je důležitá pro imobilizaci na nosič. Na pozicích 91 a 274 jsou žlutým pozadím vyznačeny kyseliny asparagové v aktivním místě. Světle zeleným pozadím jsou zvýrazněny cysteiny tvořící disulfidovou vazbu: 104 – 109, 265 – 269, 308 - 341.

10	20	30	40	50	60
MKWLLLLSLV	VLSECLVKVP	LVRKKSRLRQN	LIKNGKLKDF	LKTHKHNPAS	KYFPEAAAL
70	80	90	100	110	120
GDEPLENYLD	TEYFGTIGIG	TPAQDFTVIF	DTGSSNLWVP	SVYCSSLACS	DHNQFNPDDS
130	140	150	160	170	180
STFEATSQEL	SITYGTGSMT	GILGYDTVQV	GGISDTNQIF	GLSETEPGSF	LYYAPFDGIL
190	200	210	220	230	240
GLAYPSISAS	GATPVFDNLW	DQGLVSQDLF	SVYLSSNDDS	GSVLLGGID	SSYYTGSLNW
250	260	270	280	290	300
VPVSVEGYWQ	ITLDSITMDG	ETIACSGGCQ	AIVDTGTSL	TGPTSAIANI	QSDIGASENS
310	320	330	340	350	360
DGEMVIS	SS	IDSLPDIVFT	INGVQYPLSP	SAYILQDDDS	CTSGFEGMDV
370	380				
GDVFIRQYYT	VFDRANNKVG	LAPVA			

P4 Aminokyselinová sekvence aspergillopepsinu z *Aspergillus saitoi*, přístupový kód databáze uniprot -Q12567

Černou barvou a podtržením je zvýrazněna sekvence odpovídající aktivované protease. Červeně je vyznačen propeptid a šedivou barvou je znázorněna signální sekvence. Tmavě zeleným pozadím je označena aminokyselina lysin (K) v sekvenci, která je důležitá pro imobilizaci na nosič. Na pozicích 101 a 283 jsou žlutým pozadím vyznačeny kyseliny asparagové v aktivním místě. Světle zeleným pozadím jsou zvýrazněny cysteiny tvořící disulfidovou vazbu 319 a 354.

10	20	30	40	50	60
MVVF	SKTAAL	VLGLSTAVSA	APAPTRKGFT	INQIARPANK	TRTVNLPGLY ARSLAKFGGT
70	80	90	100	110	120
VPQSVKEAAS	KGSAVTTTPQN	NDEEYLTPVT	VGKSTLHLDF	DTGSADLWVF	SDELPSSEQT
130	140	150	160	170	180
GHDLYTPSSS	ATKLSGYSD	ISYGDGSSAS	GDVYRDTVTV	GGVTTNKQAV	EAASKISSEF
190	200	210	220	230	240
VQDTANDGLL	GLAFSSINTV	QPKAQTTFFD	TVKSQLDSPL	FAVQLKHDAP	GVYDFGYIDD
250	260	270	280	290	300
SKYTGSIITYT	DADSSQGYWG	FSTDGYSIGD	GSSSSSGFSA	IADTGTTLIL	LDDEIVSAYY
310	320	330	340	350	360
EQVSGAQESY	EAGGYVFS	CS	TDLPDFTVVI	GDYKAVVPGK	YINYAPVSTG SSTCYGGIQS
370	380	390			
NSGLGLSILG	DVFLKSQYVV	FNSEGP	KLGF	AAQA	

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka